

**Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenasen, Module in der
Evolution genetischer Netzwerke:
Studien zur Genregulation und Phylogenie in Cyanobakterien
und Spirochaeten**

Der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

genehmigte
Dissertation

von Rainer Figge
aus München

1. Referent: Prof. Dr. Rüdiger Cerff

2. Referent: Prof. Dr. Ralf-Rainer Mendel

eingereicht am: 07.10.1999

mündliche Prüfung (Disputation) am: 31.01.2000

Druckjahr: 2000

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch Prof. Dr. Rüdiger Cerff, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen:

Figge, R. M., Schubert, M., Brinkmann, H. and Cerff, R. (1999). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene diversity in eubacteria and eukaryotes: evidence for intra- and inter-kingdom gene transfer, *Mol Biol Evol* **16**, 429-440.

Figge, R. M., Cassier-Chauvat, C., Chauvat, F. and Cerff, R. (1999). The redox regulated *Synechocystis gap2* gene harbors a conserved enhancer motif and a gram-positive like –16 promoter box retained in some chloroplasts, *Mol Microbiol* in press.

Figge, R. M. and Cerff, R. (1999). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene diversity in spirochetes: a case study for horizontal gene transfer, in preparation.

Tagungsbeiträge:

Figge, R. M., Cassier-Chauvat, C., Chauvat, F. and Cerff, R. Regulation of the *gap2* gene in *Synechocystis* PCC6803. Posterbeitrag auf dem „IX International Symposium on phototrophic Prokaryotes“, Wien 6.-13. September 1997.

Figge, R. M., Cassier-Chauvat, C., Chauvat, F. and Cerff, R. Regulation of the *gap2* gene in *Synechocystis* PCC6803. Posterbeitrag auf der Gordon research conference „The Molecular basis of one-carbon Metabolism“, Henniker (NH), 28. Juni – 3. Juli 1998.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Die molekulare Phylogenie der Eubakterien	1
1.2.	Die Endosymbiontenhypothese und die Entstehung der Eukaryoten	3
1.3.	Die Rolle der Spirochaeten in der Evolution der Eukaryoten	5
1.4.	Genregulation in Cyanobakterien, den freilebenden Verwandten der Chloroplasten	6
1.5.	GAPDH Gene als Marker fundamentaler Evolutionsprozesse	8
1.6.	Ziel dieser Arbeit	11
2.	Material und Methoden	12
2.1.	Chemikalien	12
2.2.	Radiochemikalien	12
2.3.	Filtermaterialien und Membranen	12
2.4.	Materialien für die Autoradiographie und Fotografie	12
2.5.	Reagenzsätze (Kits)	13
2.6.	Enzyme	13
2.7.	Verwendete bakterielle Stämme und Plasmide	14
2.8.	Anzuchtbedingungen	15
2.9.	Konjugation zwischen <i>Synechocystis</i> und <i>E. coli</i> , Transformation von <i>Synechocystis</i> und Herstellung von Insertionsmutanten	15
2.10.	Molekularbiologische Techniken	17
2.10.1.	Gerichtete Mutagenese des <i>gap2</i> Promoters	18
2.10.2.	RNA/DNA-Isolation aus <i>Synechocystis</i> , <i>Gloeobacter</i> und Spirochaeten	18
2.10.3.	Primer-Verlängerung zur Ermittlung des Transkriptionsstartpunkts	19
2.10.4.	Mung Bohne Nuklease Analyse (MBNA, mung bean nuclease protection assay)	19
2.10.5.	Bestimmung von Chloramphenicolacetyltransferase (CAT) Aktivitäten in <i>Synechocystis</i>	20
2.10.6.	Anreicherung von DNA-Bindeproteinen mittels Heparin-Sepharose Chromatographie und Gelretardationsexperimente	20
2.10.7.	Klonierung und Sequenzierung von GAPDH Genen	21
2.11.	Phylogenetische Analyse der GAPDH Sequenzen	22
2.12.	Abkürzungen	24

3.	Ergebnisse	25
3.1.	Etablierung von GAPDH Sequenzen und deren phylogenetische Analyse	25
3.1.1.	Klonierung von partiellen GAPDH Genen aus Cyanobakterien und Spirochaeten	25
3.1.2.	Phylogenetische Analyse von GAPDH Sequenzen	27
3.1.3.	Sequenzanalyse	30
3.1.4.	Die Topologie des Gap-II Baums verändert sich in Abhängigkeit der Taxonstichprobe der Außengruppe	34
3.2.	Analyse der transkriptionellen Regulation von <i>gap</i> Genen in <i>Synechocystis</i>	37
3.2.1.	Einfluß von Licht/Dunkel-Phasen und Inhibitoren des Elektronenflusses auf die Transkriptionsrate der Gene <i>gap1</i> und <i>gap2</i>	37
3.2.2.	Bestimmung des Transkriptionsstartpunkts des <i>gap2</i> Gens	41
3.2.3.	Die Expression des <i>gap2</i> Gens wird durch <i>cis</i> -Elemente reguliert, die sich im 5'- und 3'-Bereich des Minimalpromotors befinden.	42
3.2.4.	Charakterisierung eines <i>Enhancer</i> -Elements im nicht translatierten 5'-Bereich des <i>gap2</i> Gens	45
3.2.5.	Partielle Aufreinigung eines Element B-spezifischen Transfaktors mittels Heparin-Sepharose Affinitätschromatographie	50
3.2.6.	Mutagenese und Analyse der -35 und -10 Region des <i>gap2</i> Minimalpromotors	54
3.2.7.	Eine -16 Region in einem cyanobakteriellen Promotor	55
3.3.	Konstruktion von Insertionsmutanten potentieller GAPDH Regulatorgene und deren phänotypische Analyse	57
3.3.1.	Insertionsmutagenese des <i>rbcR1</i> , <i>rbcR2</i> und <i>lysR</i> Gens und Charakterisierung der Mutanten	57
3.3.2.	Transkriptionelle Analyse der drei Regulatorgene	59
3.3.3.	Autoregulation des <i>rbcR2</i> Gens	61
4.	Diskussion	63
4.1.	Das GAPDH System als Indikator fundamentaler Evolutionsprozesse	63
4.1.1.	Eubakterielle GAPDH Gendiversität in Spirochaeten: Genduplikation im gemeinsamen Vorfahren oder Cladogenese verbunden mit lateralem Gentransfer?	64

4.1.2.	Gentransfer-Ereignisse zwischen und innerhalb eubakterieller Phyla	67
4.1.3.	Ist <i>Gloeobacter</i> ein ancestrales oder sehr stark abgeleitetes Cyanobakterium?	68
4.1.4.	Eubakterielle <i>gap1</i> Gene sind die Vorfahren der kernkodierten <i>GapC</i> Gene in Eukaryoten.	69
4.1.5.	Ist die glykosomale GAPDH der Euglenozoa spirochaetalen Ursprungs?	71
4.1.6.	Sind Prochlorophyta die direkten Vorfahren der Chloroplasten?	73
4.1.7.	Die Position von <i>Euglena</i> als Artefakt der phylogenetischen Analyse	74
4.2.	Genregulation von GAPDH Genen im Cyanobakterium <i>Synechocystis</i> PCC6803	75
4.2.1.	Redox-Regulation von <i>gap1</i> und <i>gap2</i> in <i>Synechocystis</i>	75
4.2.2.	Ein konserviertes Enhancer Motiv im <i>gap2</i> Promotor	77
4.2.3.	Ein für gram-positive Bakterien typisches Promotorelement (-16 Box) in einem cyanobakteriellen Promotor	78
4.2.4.	Sind Regulatoren der LysR Familie an der Kontrolle der <i>gap2</i> Expression beteiligt?	80
4.3.	Ausblick: Evolution von genetischen Netzwerken	81
5.	Zusammenfassung	83
6.	Literaturverzeichnis	85

1. Einleitung

1.1. Die molekulare Phylogenie der Eubakterien

Das Forschungsgebiet der Evolutionsbiologie hat in den letzten vier Jahrzehnten einen enormen Erkenntnisfortschritt zu verzeichnen. Während die erste Revolution der Evolutionsbiologie, eingeleitet durch Darwin und sein Werk „On the origin of species by means of natural selection“ (Darwin, 1859), die Idee einer durch Gott gegebenen Unveränderlichkeit der Lebewesen zu Fall brachte und damit den Grundstein für einen evolutiven Ursprung aller Lebewesen legte, führte die Entwicklung von molekularbiologischen Techniken und die damit verbundene Verfügbarkeit von DNA- und Protein-Sequenzen zu einer erneuten Revolution. Mitte der sechziger Jahre propagierten Zuckerkandl und Pauling basierend auf Cytochrom C- und Ferredoxin-Sequenzen, daß die Rate der Aminosäure Substitutionen in verschiedenen Genen von Säugern ungefähr konstant ist, und entwickelten damit das Konzept der molekularen Uhr (Zuckerkandl und Pauling, 1965). Dieses wurde und wird zwar sehr kontrovers diskutiert, brachte aber auch die Erkenntnis, daß basierend auf Protein-Sequenzen aus unterschiedlichen Organismen deren Verwandtschaftsbeziehungen (Phylogenie) ermittelt werden können. Vor der Entwicklung der Molekularbiologie wurden ausschließlich morphologische und verhaltensbiologische Charakteristika zur Rekonstruktion von Verwandtschaftsbeziehungen verwendet. Da Prokaryoten vergleichsweise wenige solcher Merkmale aufweisen, ist man zur Erstellung bakterieller Phylogenien auf Sequenz-Daten angewiesen.

Mitte der siebziger Jahre begannen Woese und seine Mitarbeiter mit dem Aufbau einer Datenbank kleiner ribosomaler RNA-Sequenzen (16S rRNA). So konnten basierend auf diesen Daten Verwandtschaftsbeziehungen der Bakterien rekonstruiert und diese in einem phylogenetischen Baum dargestellt werden (Fox et al., 1980). Abb. 1 zeigt schematisch einen entsprechenden Baum und verdeutlicht, daß sich die Eubakterien in mindestens 12 Phyla einteilen lassen. 16S rRNA-Sequenzen besitzen gegenüber anderen molekularen Markern einige Vorteile. Diese beruhen auf ihrer Universalität, d. h. ihrer Präsenz in Eubakterien, Archaeobakterien, Eukaryoten und den Genomen der Organellen, auf dem Vorhandensein von schnell und langsam evolvierenden Bereichen und auf der allgemein konservierten Struktur (Woese, 1987). Desweiteren zeichnen sie sich durch ihre komplexe (über 100 Protein und RNA-Interaktionen) und vermutlich schon sehr lang existierende Einbindung in die Translationsmaschinerie der Zelle aus (Green und Noller, 1997). Eine derartige Vielzahl von Interak-

tionen macht lateralen Gentransfer dieser Moleküle unwahrscheinlich. Trotzdem wird die Richtigkeit des auf kleinen ribosomalen RNA-Sequenzen beruhenden Baumes, des derzeit wohl besten Referenzsystems aller Organismen, in mehreren kürzlich erschienenen Studien angezweifelt (zusammengefaßt in [Doolittle, 1999]).

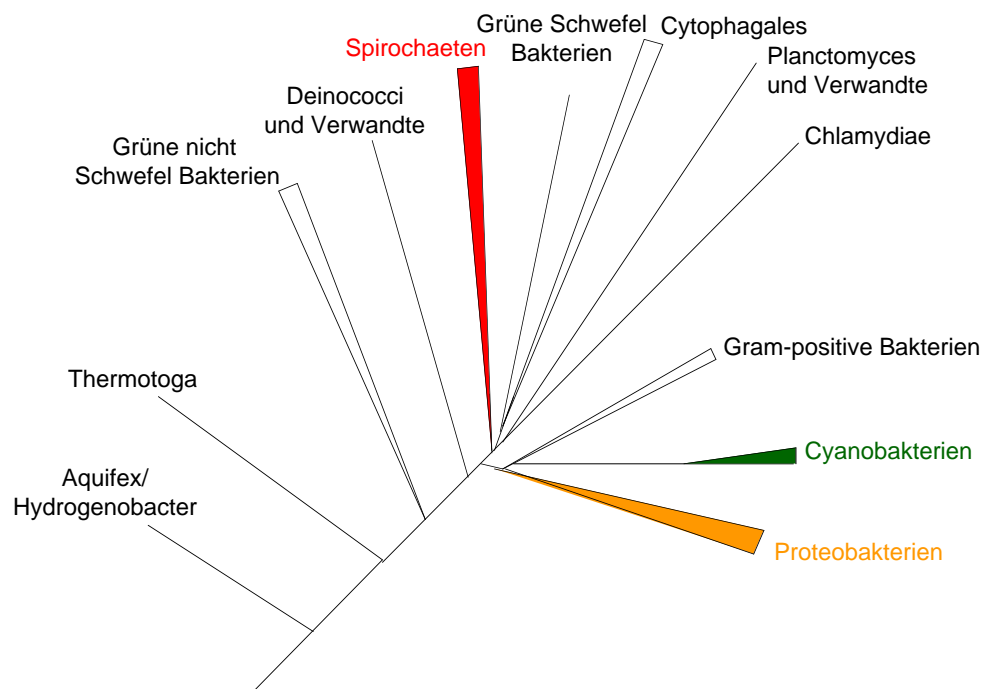


Abb.1 Phylogenetischer Baum der Eubakterien basierend auf 16S rRNA-Sequenzen (nach [Woese, 1987], verändert). Für diese Arbeit besonders wichtige Phyla sind farblich gekennzeichnet: Cyanobakterien (grün), Proteobakterien (orange) und Spirochaeten (rot).

Die Analyse von 16S rRNA-Fragmenten führte Ende der siebziger Jahre auch zu der Entdeckung, daß Bakterien nicht ein, sondern zwei distinkte Primärreiche bilden, nämlich die Eubakterien und Archaeobakterien (Woese und Fox, 1977). Die Entdeckung dieser dritten Domäne des Lebens (Archaeobakterien) warf viele neue Fragen auf, welche die Verwandtschaftsbeziehungen der Domänen untereinander und damit eng verbunden die Frage nach dem letzten gemeinsamen Vorfahren der drei Domänen betreffen (Doolittle, 1978; Woese und Fox, 1977). Diesbezüglich wurde erst 1989 durch die Wurzelung des universalen Baums mittels paraloger, sehr früh duplizierter Gene der ATPase und EF-TU, EF-G Familien ein weiterer Meilen-

stein erreicht. In beiden phylogenetischen Analysen sind Eukaryoten näher mit Archaeobakterien als mit Eubakterien verwandt (Gogarten et al., 1989; Iwabe et al., 1989).

1.2. Die Endosymbiontenhypothese und die Entstehung der Eukaryoten

Wie wir heute wissen, können Hypothesen zur Entstehung der Eukaryoten und die Frage nach dem letzten gemeinsamen Vorfahren aller Organismen nicht mehr separat von der Endosymbiontenhypothese betrachtet werden. Schon 1905 in Ansätzen von Mereschkowsky formuliert (Mereschkowsky, 1905), besagt die Endosymbiontenhypothese, daß Mitochondrien und Plastiden ihren Ursprung in Bakterien-ähnlichen Organismen haben, die von einer einen Nukleus enthaltenden Zelle aufgenommen wurden und mit dieser in eine symbiotische Verbindung traten (Margulis, 1970). Daß diese lange umstrittene Hypothese heute allgemein als bewiesen gilt, beruht auf folgenden Gründen, die nacheinander für (i) Plastiden und (ii) Mitochondrien aufgeführt sind.

(i) Biochemische und ultrastrukturelle Untersuchungen legten schon relativ früh einen evolutionären Zusammenhang zwischen Plastiden und Cyanobakterien nahe (Stanier, 1970). Vergleichende Analysen von Genorganisation und Genexpression (z. B. Rifampicin hemmt die Transkription in Plastiden und Cyanobakterien [Loiseaux et al., 1975]) unterstützten ebenfalls einen cyanobakteriellen, endosymbiontischen Ursprung aller Plastiden. Phylogenetische Analysen von Einzelgenen (Gray, 1992; Loiseaux-de Goer, 1994; Douglas, 1994; Bhattacharya und Medlin, 1995) und schließlich sogar von vollständigen Plastidengenomenen (Martin et al., 1998) lassen keinen Zweifel daran, daß Plastiden einen cyanobakteriellen Vorfahren besitzen. Auch ein monophyletischer Ursprung aller Plastiden, die einer primären Endosymbiose entstammen, wird heute als sehr wahrscheinlich angesehen (zusammengefaßt in [Delwiche und Palmer, 1997]).

(ii) Ein α -proteobakterieller Ursprung der Mitochondrien wurde schon 1975 aufgrund biochemischer Daten gefordert (John und Whatley, 1975). Phylogenetische Analysen kleiner mitochondrialer ribosomaler RNA-Sequenzen zusammen mit ihren eubakteriellen Homologen zeigten, daß der Vorfahr der Mitochondrien sich im Feld der α -Proteobakterien befindet (Yang et al., 1985). Die nächsten noch lebenden Verwandten sind vermutlich intrazelluläre

Parasiten der Gattungen *Rickettsia*, *Anaplasma* und *Ehrlichia* (Gray und Spencer, 1996). Durch Vergleiche zwischen dem Bakterien-ähnlichsten mitochondrialen Genom aus *Reclinomonas americana* (Lang et al., 1997) und dem Mitochondrien-ähnlichsten eubakteriellen Genom aus *Rickettsia prowazekii* (beide inzwischen vollständig sequenziert) konnten einige Genanordnungen (z. B. *rplKAJL* und *rpoBC*) identifiziert werden, die in beiden Genomen identisch sind und vermutlich noch aus dem gemeinsamen Vorfahren stammen (Andersson et al., 1998). Phylogenetische Analysen von 16S rRNA- (Gray und Spencer, 1996) und Protein-Daten unterstützen zudem einen monophyletischen Ursprung aller Mitochondrien (Viale und Arakaki, 1994; Gray et al., 1999).

Die Endosymbiontentheorie im traditionellen Sinn postuliert, daß das Protomitochondrium (der Vorfahr aller Mitochondrien) von einer Zelle aufgenommen wurde, die schon einen Zellkern und damit typisch eukaryotische Züge besaß (Margulis, 1970). Somit wurden Mikrosporidien, Parabasalia und Diplomonaden, die keine Mitochondrien besitzen, als primär mitochondrienlose Eukaryoten angesehen und als sogenannte Archaezoa („Urtiere“) bezeichnet (Cavalier-Smith, 1987). Kürzlich konnte jedoch gezeigt werden, daß die Genome dieser vermeintlich amitochondrialen Eukaryoten ebenfalls Gene mitochondrialen Ursprungs besitzen (Clark und Roger, 1995; Germot et al., 1996; Hirt et al., 1997; Hashimoto et al., 1998; Roger et al., 1998). Konsequenterweise muß angenommen werden, daß die Archaezoa ursprünglich ebenfalls Mitochondrien besaßen, diese aber im Laufe der Evolution verloren haben (zusammengefaßt in [Keeling, 1998]). In Parabasalia findet man anstatt der Mitochondrien ein anderes Organell, das Hydrogenosom, in dem ein Teil der Glykolyse abläuft (Müller, 1993). Ein mitochondrialer Ursprung der Hydrogenosomen ist erst seit kurzer Zeit basierend auf Untersuchungen von Hitzeschock-Proteinen (Hsp Familie) allgemein akzeptiert (Bui et al., 1996). Weiter erhärtet wurde diese Erkenntnis durch die Entdeckung eines Genoms in dem Hydrogenosom des Ciliaten *Nyctotherus ovalis* (Akhmanova et al., 1998). Eine plausible Erklärung für den mitochondrialen Ursprung dieser Organellen lieferte eine neue Hypothese zur Entstehung der Eukaryoten (siehe unten). Schon 1989 hatten Zillig et al. basierend auf einem Vergleich der RNA-Polymerasen aus den drei Domänen postuliert, daß Eukaryoten möglicherweise das Ergebnis einer Fusion aus Archaeobakterien und Eubakterien sind, und daß es erst nach der Fusion zum endosymbiontischen Erwerb der Mitochondrien kam. Martin und Müller haben kürzlich eine neue Hypothese (Die Wasserstoffhypothese [Martin und Müller, 1998]) aufgestellt, die im Gegensatz zu Zillig die Entstehung der Eukaryoten und der Mitochondrien als ein Elementarereignis sieht, nämlich als die Endosymbiose eines α -Proteobakteriums in

einer strikt anaeroben archaebakteriellen Wirtszelle. Nachfolgender Gentransfer, insbesondere von operationalen Genen (Gene, die Enzyme des Grundstoffwechsels kodieren [Rivera et al., 1998]), vom Endosymbiont zum archaebakteriellen Wirt führte zu dem heute beobachteten chimären Genom der Eukaryoten und gleichzeitig zur Reduktion des mitochondrialen Genoms. Auch wenn noch einige Zweifel an der Richtigkeit der Wasserstoffhypothese bestehen (Brinkmann und Philippe, 1999), ist mit dieser neuen Sichtweise zur Entstehung der Eukaryoten in gewisser Weise die Frage nach dem letzten gemeinsamen Vorfahren der drei Domänen *ad absurdum* geführt.

1.3. Die Rolle der Spirochaeten in der Evolution der Eukaryoten

Spirochaeten bilden eines der wenigen eubakteriellen Phyla, das sich schon durch morphologische Charakteristika deutlich von den anderen Phyla absetzt (Woese, 1987). So unterscheiden sie sich in ihrem Zellaufbau und der Art ihrer Bewegungsweise von allen anderen Bakterien (Holt, 1978). Ein helikaler Protoplasmazyylinder ist von einer äußeren Hüllmembran umgeben, die in ihrem Aufbau der äußeren Zellmembran gram-negativer Eubakterien ähnelt (Schlegel, 1985). Zwischen dem Protoplasmazyylinder und der Hüllmembran besitzen Spirochaeten jedoch interne Bewegungsorganellen, die als periplasmatische Flagellen oder Achsialfibrillen bezeichnet werden und in ihrer Anzahl von zwei bis zu Hunderten schwanken. Ultrastrukturell und von ihrer Zusammensetzung her entsprechen diese Achsialfibrillen den externen Geißeln anderer Bakterien (Canale-Parola, 1977; Holt, 1978). Bedingt durch die Anordnung der Achsialfibrillen zeichnen sich Spirochaeten durch eine schraubenartige Fortbewegungsweise aus.

Spirochaeten sind in der Natur weit verbreitet. Viele existieren als freilebende Formen. Daneben sind sie aber auch mit einer außergewöhnlichen Bandbreite von Wirten assoziiert, die von Protozoen bis zu Termiten, Mollusken und Säugern reicht (Harwood und Canale-Parola, 1984). In den meisten Fällen sind diese Assoziationen kommensaler oder mutualistischer Natur, aber es existieren auch einige pathogene Spirochaeten. Unter diesen sind besonders der Syphiliserreger *Treponema pallidum* und die Spirochaete *Borrelia burgdorferi*, Erreger der Zecken-Borreliose (Lyme-Krankheit), zu erwähnen. Von beiden Spirochaeten wurde kürzlich

aufgrund ihrer humanmedizinischen Bedeutung die vollständige Genomsequenz ermittelt (Fraser et al., 1997; Fraser et al., 1998). Daneben sind die Spirochaeten aber auch die Auslöser der Schweine-Dysenterie (Erreger: *Brachyspira hyodysenteriae*), Leptospirose (auch Weils-Krankheit genannt; *Leptospira interrogans*) und des Rückfallfiebers (*Borrelia recurrentis*) (Madigan et al., 1997).

Aufgrund der Morphologie der Spirochaeten, die den Flagellen der Eukaryoten in gewisser Weise ähnelt, und der Lebensweise einiger Vertreter, die als Epibionten insbesondere auf Flagellaten im Enddarm der Termiten vorkommen, wurde vermutet, daß sich die Flagellen der Eukaryoten aus Spirochaeten entwickelt haben könnten (Margulis, 1970). Diese Annahme wurde durch Studien mit Antikörpern gegen Tubulin, die spezifisch mit spirochaetalen Proteinen reagierten, noch erhärtet (Margulis et al., 1978). Bis heute ist aber in Spirochaeten und auch allen anderen Eubakterien kein Tubulin-kodierendes Gen gefunden worden (Bermudes et al., 1994), wenn auch mit dem Zellteilungsprotein FtsZ ein entfernter Tubulinverwandter charakterisiert wurde (Bi und Lutkenhaus, 1991). Ein spirochaetaler Ursprung der eukaryotischen Flagellen erscheint somit äußerst unwahrscheinlich. Vielleicht spielen Spirochaeten aufgrund ihrer Vielzahl von Assoziationen aber trotzdem eine besondere Rolle in der Evolution der Eukaryoten. So berichtete kürzlich Doolittle (Doolittle, 1999), daß offensichtlich einige Eukaryoten Elongationsfaktoren (EF-G) benutzen, die nicht mitochondrialen, sondern spirochaetalen Ursprungs sind.

1.4. Genregulation in Cyanobakterien, den freilebenden Verwandten der Chloroplasten

Cyanobakterien könnte man als freilebende Chloroplasten bezeichnen, da sie aufgrund ihrer phylogenetischen Herkunft (siehe 1.2) in ihrer Struktur und biochemischen Ausstattung letzteren sehr ähnlich sind. Ebenso wie photosynthetische Eukaryoten, sind Cyanobakterien auf Licht als primäre Energiequelle angewiesen. Licht dient daneben aber auch als wichtiges Signal für die Genregulation. Erwartungsgemäß beeinflussen Veränderungen in der Lichtqualität und auch Quantität die Expression von Genen, die Komponenten des photosynthetischen Apparates kodieren (Grossman et al., 1993; Tandeau de Marsac und Houmard, 1993; Golden, 1995). Zusätzlich werden aber auch andere Gene, die in keiner direkten Beziehung zur

Lichtabsorption stehen, lichtabhängig reguliert (z. B. [Kis et al., 1998; Mazouni et al., 1998]). Die Übertragung dieser Lichtsignale scheint in Cyanobakterien ebenso wie in Pflanzen durch direkte Reizerkennung mittels Photorezeptoren (Kehoe und Grossman, 1996; Fankhauser und Chory, 1997; Yeh et al., 1997) oder indirekt durch Messen von physiologischen Veränderungen in der Zelle vonstatten zu gehen. In Cyanobakterien konnte gezeigt werden, daß auch der photosynthetische Elektronentransport (Campbell et al., 1993) oder die daraus resultierende Veränderung im Redoxpotential der Zelle eine Antwort auf Transkriptionsebene (Garcia-Dominguez und Florencio, 1997; Reyes und Florencio, 1995) auslösen kann.

Prokaryoten reagieren oft auf veränderte Umweltbedingungen mittels transkriptioneller Kontrollmechanismen. Diese beruhen meistens auf einer Bindung regulatorischer Proteine oder alternativer Sigma-Faktoren an spezifische Bindungsstellen innerhalb oder in der Nähe der Promotorregion (Vicente et al., 1999). Bindungsstellen für mögliche Regulatoren, die weit entfernt vom Promotor liegen, sind dagegen weitaus seltener (Gralla und Collado-Vides, 1996). Funktionieren diese Bindungsstellen unabhängig von ihrer Position und Orientierung, so werden sie als transkriptionelle „Enhancer-Elemente“ bezeichnet. Diese sind in fast allen bekannten Fällen mit σ^{54} -abhängigen Promotoren gekoppelt, die ein besonderes Erkennungsmotiv (-24; -12) besitzen (Kustu et al., 1991). Promotoren dieser Art wurden aber bisher in Cyanobakterien noch nicht gefunden. Ein Vergleich von cyanobakteriellen Promotoren mit bekanntem Transkriptionsstartpunkt zeigte, daß diese fast alle eine gut konservierte -10 Region besitzen, die der Konsensussequenz (5'-TATAAT-3') von $\sigma^{70}/sigA$ -Promotoren aus *E. coli*/*B. subtilis* entspricht. Eine -35 Region fehlt dagegen meistens in cyanobakteriellen Promotoren (Curtis und Martin, 1994). Abweichungen in der cyanobakteriellen Promotor-Architektur beruhen möglicherweise auf der unterschiedlichen Zusammensetzung der cyanobakteriellen RNA-Polymerase, welche die N- und C-terminalen Bereiche der *E. coli* β' -Untereinheit als zwei selbständige Untereinheiten besitzt (Schneider et al., 1987). Untersuchungen *in vitro* unterstützen aber nur zum Teil eine vom *E. coli* Enzym abweichende Spezifität der cyanobakteriellen RNA-Polymerase (Miller et al., 1979; Schneider et al., 1991; Schyns et al., 1998). In *E. coli* Promotoren kann eine verlängerte -10 Region (extended -10 region) mit dem Konsensus 5'-TG-3' zumindest teilweise das Fehlen einer funktionellen -35 Region kompensieren (Keilty und Rosenberg, 1987; Kumar et al., 1993). In gram-positiven Bakterien sind bis zu vier Basenpaare mit dem Konsensus 5'-TRTG-3' direkt stromaufwärts von der -10 Region, deshalb auch -16 Region genannt (Moran et al., 1982; Voskuil und Chambliss, 1998), oft an der transkriptionellen Regulation beteiligt. In Cyanobakterien wurde

kürzlich eine funktionelle verlängerte -10 Region beschrieben (Mazouni et al., 1998). Die generelle Bedeutung dieser Region in der transkriptionellen Regulation in Cyanobakterien ist allerdings noch nicht geklärt.

Cyanobakterien nutzen ebenso wie Pflanzen und einige Proteobakterien den Calvin-Zyklus zur Assimilation von Kohlendioxid (Gibson und Tabita, 1996). Die transkriptionelle Regulation der zwei Calvin-Zyklus spezifischen Gene, Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase (Rubisco, durch die Gene *rbcLS* kodiert) und Phosphoribulokinase (*prk*) ist in *Synechocystis* untersucht worden und für beide konnte eine lichtabhängige Regulation gezeigt werden (Mohammed und Jansson, 1989; van Thor et al., 1998). Mohammed und Janson (1991) bewiesen außerdem, daß die Transkription der Rubisco Gene eines funktionellen Photosystems II bedarf. Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase ist ein weiteres Enzym des Calvin-Zyklus, spielt aber auch eine wichtige Rolle in der Glykolyse. Cyanobakterien besitzen wie Pflanzen zwei distinkte GAPDH Enzyme, die unterschiedliche Funktionen innerhalb der Zelle übernehmen. Dabei ist Gap1 für den glykolytischen Abbau von Glukose und Gap2 für einen funktionierenden Calvin-Zyklus und Glukoneogenese zwingend erforderlich (Koksharova et al., 1998). In Pflanzen existiert eine lichtabhängige, transkriptionelle Regulation der homologen Gene *GapC* (*gap1*) und *GapAB* (*gap2*), die über Phytochrom und einen Blaulichtrezeptor gesteuert wird (Dewdney et al., 1993; Conley und Shih, 1995). Die transkriptionelle Regulation der *gap* Gene im Cyanobakterium *Synechocystis* war zu Beginn dieser Arbeit noch nicht untersucht.

1.5. GAPDH Gene als Marker fundamentaler Evolutionsprozesse

Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH, phosphorylierend: EC 1.2.1.12 und 1.2.1.13) ist ein sehr altes und nahezu ubiquitär verbreitetes Enzym des C-Grundstoffwechsels, das die reversible Umwandlung von Glycerinaldehyd-3-phosphat zu 1,3-Diphosphoglycerat katalysiert (Forthergill-Gilmore und Michels, 1993). Zwei distinkte Typen von phosphorylierender GAPDH, die als Klasse I und Klasse II bezeichnet werden, finden sich in Eubakterien und Archaeobakterien. Wohingegen Enzyme der Klasse II ausschließlich in Archaeobakterien vorzukommen scheinen (Hensel et al., 1989), ist Klasse I GAPDH das klas-

sische Enzym der Glykolyse und des Calvin-Zyklus in Eubakterien und Eukaryoten und ist bisher nur in einem Archaeobakterium gefunden worden (Prüß et al., 1993; Brinkmann und Martin, 1996).

Verteilt auf verschiedene eubakterielle Genome besitzen Klasse I GAPDH Gene einen außergewöhnlichen Grad an Sequenzdiversität in Form von Genfamilien. So findet man z. B. drei sehr divergente *gap* Gene in den Genomen von *Anabaena variabilis* (Martin et al., 1993), *Escherichia coli* (Blattner et al., 1997) und *Pseudomonas aeruginosa* (siehe hierzu Pseudomonas Genom-Projekt) und zwei sehr divergente *gap* Sequenzen in den Genomen von *Synechocystis* PCC6803 (Kaneko et al., 1996; Koksharova et al., 1998) und *Yersinia pestis* (TIGR homepage). Allerdings besitzen diese Genome nicht dieselben zwei oder drei *gap* Gene, sondern jeweils einen Teil einer wesentlich größeren GAPDH Genfamilie, was durch die Präsenz von weiteren offensichtlich paralogen *gap* Genen in anderen eubakteriellen Genomen (*Clostridium*, *Thermotoga*, *Streptomyces*) noch untermauert wird (Brown und Doolittle, 1997; Viscogliosi und Müller, 1998).

Alle eukaryotischen GAPDH Gene sind kernkodiert und offensichtlich eubakteriellen Ursprungs (Cerff, 1995). Der größte Teil der eukaryotischen GAPDH stammt von nur zwei distinkten Genen der GAPDH Genfamilie ab, die in Cyanobakterien als *gap1* und *gap2* bezeichnet werden (Martin et al., 1993; Cerff, 1995; Brown und Doolittle, 1997; Martin und Schnarrenberger, 1997). Das eubakterielle *gap1* Gen ist nahe mit dem eukaryotischen *GapC* Gen verwandt und beide spielen in der Regel eine wichtige Rolle in der Glykolyse und Glukoneogenese. Der Ursprung des *GapC* Gens liegt vermutlich im proteobakteriellen Vorfahren der Mitochondrien (Smith, 1989; Martin et al., 1993; Liaud et al., 1994), obwohl eubakterielle *gap1* Gene auch in anderen eubakteriellen Phyla (wie Cyanobakterien) vorkommen. Eine bemerkenswerte Ausnahme hierzu ist das *GapC* Gen aus *Euglena gracilis* und sein Pendant in Trypanosomen, das aufgrund des basalen Abzweigens dieser Organismen am *Gap1/GapC* Baum vermutlich nicht mitochondrialen Ursprungs ist (Henze et al., 1995). Eine weitere Ausnahme findet sich ebenfalls in einigen Trypanosomen, die ein zweites, cytosolisches *GapC* Enzym besitzen, das erstaunlich hohe Ähnlichkeit zu *Gap1* aus Enterobakterien aufweist (Michels et al., 1991; Henze et al., 1995). Eine Besonderheit sind die *Gap* Gene der Parabasalia, einer Gruppe amitochondrialer Protisten (siehe auch 1.2.). Diese besitzen im Gegensatz zu allen anderen Eukaryoten glykolytische GAPDH Enzyme, die nicht von eubakteriellen *gap1* Genen abstammen, sondern vermutlich von einem *gap* Gen einer eubakteriellen Entwicklungslinie, deren Ursprung bisher nicht geklärt ist (Viscogliosi und Müller, 1998).

Eubakterielle *gap2* Gene zeigen nur 40 bis 50% Sequenzähnlichkeit zu *gap1* Genen. Erstere, die bisher nur in Cyanobakterien gefunden wurden, sind den kernkodierten *GapAB* Genen aus Pflanzen, Grün- und Rotalgen und *Euglena gracilis* sehr ähnlich und fanden mit großer Wahrscheinlichkeit im Rahmen der plastidären Endosymbiose Eingang in das Genom obiger Organismen (Brinkmann et al., 1989; Martin et al., 1993; Kersanach et al., 1994; Liaud et al., 1994; Henze et al., 1995). Somit besitzen Cyanobakterien und photosynthetische Eukaryoten mit grünen und roten Plastiden zwei hoch divergente GAPDH Enzyme, die sich in ihrer Kofaktorspezifität und ihrer Rolle im Zucker-Phosphat-Metabolismus unterscheiden. Das glykolytische (katabole) Enzym ist in Pflanzen (GapC) und Cyanobakterien (Gap1) NAD spezifisch, wohingegen das photosynthetische (glukoneogenetische) Enzym in Pflanzen (GapAB) NADP abhängig und in Cyanobakterien (Gap2) bispezifisch (NAD und NADP) ist (Cerff, 1978; Koksharova et al., 1998).

1.6. Ziel dieser Arbeit:

Ziel dieser Arbeit war es, zwei thematisch verwandte Schwerpunkte zu bearbeiten:

1. Die GAPDH Gendiversität in Eubakterien, insbesondere in Cyanobakterien und Proteobakterien, ist von besonderem Interesse, da sie als Donoren der eukaryotischen GAPDH Gene gelten. Da bisher nur wenige cyanobakterielle GAPDH Gene bekannt waren, sollten in dieser Arbeit weitere Gene bevorzugt aus solchen Cyanobakterien, die sich durch besondere Eigenschaften (wie z. B. Besitz von Chlorophyll b, das sonst nur in Pflanzen vorkommt) auszeichnen, kloniert werden. Es wurde erwartet, daß phylogenetische Analysen der zugehörigen Sequenzen eine genauere Einordnung dieser speziellen Cyanobakterien und auch der photosynthetischen Eukaryoten innerhalb der cyanobakteriellen Radiation ermöglichen würden.

Der phylogenetische Ursprung der glykosomalen GapC Sequenz der Trypanosomen war bisher ungeklärt. Aufgrund von Datenbanksuchen konnte in dieser Arbeit ein *gap* Gen aus der Spirochaete *Treponema pallidum* identifiziert werden, das eindeutig zu diesen GapC Sequenzen homolog ist. Diese nahe Verwandtschaft macht Spirochaeten als weitere mögliche Donoren eukaryotischer GAPDH Gene zu einem interessanten Studienobjekt. Es wurde zugrunde gelegt, daß eine umfassende Analyse von *gap* Genen aus verschiedensten spirochaetalen Spezies den eubakteriellen Ursprung der glykosomalen GapC Sequenzen aus Trypanosomen beweisen könnte.

2. Cyanobakterien besitzen meist zwei GAPDH Enzyme, die zu den beiden in Pflanzen charakterisierten Enzymen homolog sind und ihnen auch in ihrer Funktion gleichen. Während die Regulation der pflanzlichen Enzyme relativ gut verstanden ist, waren zu Beginn dieser Arbeit in Cyanobakterien hierzu noch keine Studien durchgeführt worden. Ziel dieser Arbeit war es, die transkriptionelle Regulation der beiden *gap* Gene in dem Cyanobakterium *Synechocystis* PCC6803 aufzuklären und mögliche Parallelen zwischen Cyanobakterien und Pflanzen zu ziehen.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien

Alle verwendeten, nicht weiter aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Bio-Rad, Boehringer, Fluka, Gibco-BRL, Linde, Merck, Pharmacia, Riedel De Haen, Roth, Serva und Sigma bezogen. Lösungen wurden generell mit *Aqua bidest.* hergestellt.

2.2. Radiochemikalien

Die verwendeten Radiochemikalien wurden alle von der Firma Hartmann Analytik bezogen:

α - ³⁵ S-dATP,	>1000 Ci/mmol
α - ³² P-dATP,	3000 Ci/mmol
γ - ³² P-ATP,	3000 Ci/mmol

2.3. Filtermaterialien und Membranen

Filter und Membranen wurden von folgenden Herstellern bezogen:

Hybond-N Nylonmembran	Amersham
Hybond-N ⁺ Nylonmembran	Amersham
Microcon-10	Amicon

2.4. Materialien für die Autoradiographie und Photographie

Röntgenfilme X-OMAT AR5, Entwickler und Fixierer wurden bei Kodak bezogen.

2.5. Reagenzsätze (Kits)

Die verwendeten Reagenzsätze wurden von folgenden Firmen bezogen:

Expand™ High Fidelity PCR System	Boehringer
Plasmid Spin Prep	Quiagen
QuiaexII Gel Extraction Kit	Quiagen
Quiaquick PCR Purification Kit	Quiagen
Rapid DNA Ligation Kit	Boehringer
Total RNA Midi Kit	Quiagen
Quick change site directed mutagenesis Kit	Stratagene

2.6. Enzyme

Enzyme und ihre zugehörigen Reaktionspuffer wurden von folgenden Firmen bezogen:

Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIP)	Biolabs
DNaseI, RNase frei	Gibco-BRL
Klenow-Fragment	Pharmacia
Lysozym	Serva
Mung Bean Nuklease	Pharmacia
Proteinase K	Merck
Restriktionsendonukleasen	Biolabs, MBI-Fermentas, Pharmacia, USB
RNase A	Pharmacia
T4 DNA-Ligase	Biolabs
T4 Polynukleotid-Kinase	Biolabs
T7 DNA-Polymerase	Pharmacia
Taq-Polymerase	Appligene, Boehringer

2.7. Verwendete bakterielle Stämme und Plasmide

Stamm oder Plasmid	Beschreibung	Quelle, Referenz
<i>Synechocystis</i> Stämme		
PCC6803	Wildtyp	PCC Sammlung
pTX, pEHY, pC	<i>gap2-cat</i> Reporter-Stämme mit Plasmidfamilien pT1-15, pEH1-7, pC1-82 (siehe Abb. 17)	
<i>Gloeobacter violaceus</i>		
PCC7421	Wildtyp	SAG Göttingen
<i>E. coli</i> Stämme		
HB101		(Boyer und Roulland-Dussoix, 1969)
CM404		(Powell et al., 1989)
XL1-Blue		(Bullock et al., 1987)
Plasmide		
pBluescript SK+	Ap ^r , Klonierungsvektor	Stratagene
pUC18	Ap ^r , Klonierungsvektor	(Vieira u. Messing, 1982)
pSB2A	Promotor Test Vektor	(Marraccini et al., 1993)
pMS1	pBluescript mit 3.2 kb <i>Hind</i> III Fragment, welches das <i>gap1</i> Gen beinhaltet.	(Koksharova et al., 1998)
pMS2	pBluescript mit 3.1 kb <i>Hind</i> III/ <i>Eco</i> RI Fragment, welches das <i>gap2</i> Gen beinhaltet.	(Koksharova et al., 1998)
pMS2.2A	893 bp <i>Pvu</i> I Fragment mit der <i>gap2</i> Promoter Region in <i>Eco</i> RV von pBluescript SK +	diese Arbeit
pG610	pUC18 mit -443 bis +167 von <i>gap2</i> in <i>Sma</i> I	“

Die mit pT, pEH und pC bezeichneten Plasmide sind Derivate von pSB2A und beinhalten die angegebenen Segmente der *gap2* Promotorregion, die in die *Sna*BI Schnittstelle kloniert wurden. Die angegebenen Nukleotidpositionen beziehen sich auf den Transkriptionsstartpunkt. Element B befindet sich zwischen +34 und +50 im *gap2* Promotor.

pT1	-443 bis +167 von <i>gap2</i>	diese Arbeit
pT3	-190 bis +167 von <i>gap2</i>	“
pT4	-190 bis +34 von <i>gap2</i>	“
pT7	-45 bis +34 von <i>gap2</i>	“
pT10	-190 bis +50 von <i>gap2</i>	“
pT11	-45 bis +167 von <i>gap2</i>	diese Arbeit

pT12	-45 bis +125 von <i>gap2</i>	“
pT13	-45 bis +50 von <i>gap2</i>	“
pB3	-45 bis +167 von <i>gap2</i> mit einer Deletion von +34 bis +50	“
pB5	-45 bis +34 von <i>gap2</i> an das 3'-Ende von +51; +167 kloniert	“
pEH1	-45 bis +50 von <i>gap2</i> , Element B umgekehrt	“
pEH2	-45 bis +34 von <i>gap2</i> , Element B stromaufwärts von -45	“
pEH3	wie pEH2, Element B umgekehrt	“
pEH4	Element B 5' von -190 bis +34 von <i>gap2</i>	“
pEH5	wie pEH4 mit Element B in umgekehrter Orientierung	“
pEH6	Element B in nativer Orientierung	“
pEH7	Element B in umgekehrter Orientierung	“

2.8. Anzuchtbedingungen

Synechocystis wurde in modifiziertem BG11 Medium (Rippka und Herdmann, 1992) autotroph bei Lichtintensitäten von 3000 Lux (SL, $37,5 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$) und 5000 Lux (HL, $62,5 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$) und photoheterotroph bei maximal 2000 Lux unter Zugabe von 50 mM Glukose angezogen.

Gloeobacter wurde in modifiziertem BG11 Medium bei Lichtintensitäten von ca. 500 Lux ($6 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$) angezogen.

2.9. Konjugation zwischen *Synechocystis* und *E. coli*, Transformation von *Synechocystis* und Herstellung von Insertionsmutanten

Die Konjugation erfolgte unter Verwendung von *E. coli* CM404 wie in Mermet-Bouvier und Chauvat, 1994 beschrieben. Die Transformation von *Synechocystis* ist in Chauvat et al., 1986 beschrieben.

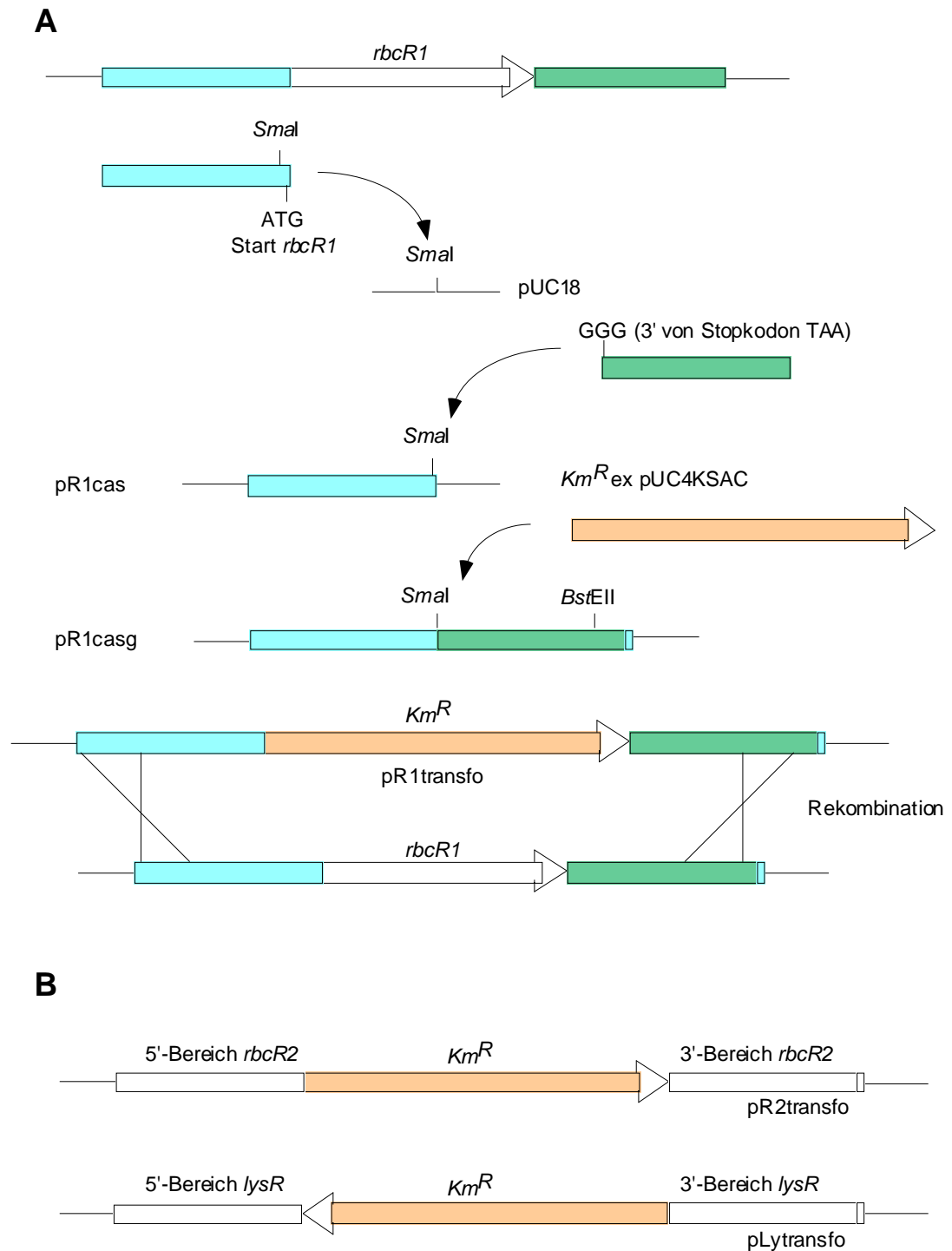


Abb. 2. Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie von Konstrukten, die für die Erzeugung einer Deletionsmutanten des Gens *rbcR1* benötigt wurden (A). Entsprechende zur Transformation eingesetzte Konstrukte der Gene *rbcR2* und *lysR* (B). Pfeilspitzen sind entsprechend der 5'- nach 3'-Orientierung der Gene angeordnet. Für eine genaue Beschreibung der Klonierungsstrategie siehe Text. Km^R : Kanamycin Resistenzgen aus pUC4KSAC.

Die Klonierungsschritte, die für die Herstellung der Mutanten der *Synechocystis cbbR* Homologen erforderlich waren, seien hier exemplarisch am Beispiel von *rbcR1* dargestellt (siehe Abb. 2A). Ein 528 bp langer Bereich stromaufwärts des *rbcR1* Startcodons wurde per PCR amplifiziert und dabei eine *SmaI* Restriktionsschnittstelle unmittelbar stromaufwärts des Startcodons erzeugt. Das erhaltene Fragment wurde in die *SmaI* Schnittstelle von pUC18 kloniert, was den Vektor pR1cas ergab. Mittels PCR wurde nun der 3'-Bereich des *rbcR1* Gens amplifiziert (562 bp) und dabei eine *SmaI* Schnittstelle unmittelbar stromabwärts des Stopkodons erzeugt. Das Amplifikat wurde mit *SmaI* geschnitten und in die *SmaI* Schnittstelle des Vektors pR1cas kloniert. Erhaltene Konstrukte (pR1casg) wurden mit *SmaI* behandelt, wobei sich nur in Klonen, die eine *SmaI* Schnittstelle besitzen, die 5'- und 3'-Bereiche des *rbcR1* Gens in der nativen Orientierung befinden. In die *SmaI* geschnittenen Klone wurde das Kanamycin-Resistenzgen aus pUC4KSAC kloniert. Abb. 2B zeigt die entsprechenden Konstrukte der Gene *rbcR2* und *lysR*. Alle drei Plasmide wurden in *Synechocystis* Wildtyp transformiert und erhaltene Transformanten unter autotrophen und photoheterotrophen Bedingungen steigendem Selektionsdruck (Km 30 µg/ml bis Km 300 µg/ml) unterworfen. Jeweils 10 Mutanten wurden mittels Southern Analyse auf vollständige Segregation getestet. Als Sonden dienten die 5'- und 3'-Bereiche der entsprechenden Gene aus den Plasmiden pR1casg, pR2casg und pLycasg. Im Fall der *rbcR1* Sonde wurde der 3'-Bereich um die Region stromabwärts der *BstEII* Schnittstelle verkürzt.

2.10. Molekularbiologische Techniken

Sämtliche verwandte Techniken der Molekularbiologie, sofern nicht gesondert aufgeführt, entsprechen Standardprotokollen aus Sambrook et al., (1989) oder den Instruktionen der Zuliefernden Firmen.

2.10.1. Gerichtete Mutagenese des *gap2* Promotors

Gerichtete Mutagenese des *gap2* Promotors wurde mit dem Quick change site directed mutagenesis Kit von Stratagene durchgeführt.

2.10.2. RNA/DNA-Isolation aus *Synechocystis*, *Gloeobacter* und *Spirochaeten*

RNA wurde aus exponentiell wachsenden *Synechocystis*-Kulturen unter Verwendung des Quiagen total RNA Midi Kits extrahiert, wobei der Aufschluß der Zellen unter flüssigem Stickstoff erfolgte.

Zudem wurde RNA auch wie folgt isoliert: *Synechocystis*-Zellen wurden pelletiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren, im Mörser gemahlen (unter flüssigem Stickstoff) und in Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (PCI, 25/24/1) aufgenommen. Nach zwei weiteren Phenolisierungsschritten wurde RNA selektiv unter Zugabe 1/4 Volumens 10 M LiCl über Nacht auf Eis gefällt.

Genomische DNA aus *Synechocystis* und *Gloeobacter* wurde wie folgt isoliert.

Exponentiell wachsende *Synechocystis*-Kulturen wurden pelletiert, in Waschpuffer (NaCl 0,12 M; EDTA 0,05 M pH 8,0) gewaschen und für 90 min mit Lysozym (13 mg/ml Endkonzentration) bei 37°C verdaut. Nach Zugabe von SDS *ad* 2,4% wurden die Kulturen eine weitere Stunde bei 37°C inkubiert und mit NaClO₄ *ad* 0,5 M versetzt. Nach zweimaliger PCI Extraktion wurde die DNA gefällt.

Plasmid-DNA wurde aus *Synechocystis*, wie in Chauvat et al., 1986 beschrieben, isoliert.

DNA aus den Cyanobakterien *Prochloron didemni* und *Prochlorococcus marinus* CCMP 1375 wurde von Dr. Roger Hiller, University of New South Wales, Sydney und Dr. Wolfgang Hess, Humboldt Universität, Berlin zur Verfügung gestellt.

Spirochaeten-Kulturen wurden von der DSM, Braunschweig und vom Royal Tropical Institute, Amsterdam bezogen. Für die Isolation von DNA aus den Spirochaeten *Leptospira biflexa*, *Leptonema illini*, *Treponema saccharophilum*, *Spirochaeta stenostrepta*, *Spirochaeta aurantia* und *Serpulina murdochii* wurde folgendes Protokoll verwendet: Die Kulturen wurden einmal

in TES (10 mM Tris/HCl pH 8,0; 0,1 M EDTA pH 8,0; 0,15 M NaCl) gewaschen und in demselben Puffer resuspendiert. Lysozym wurde *ad* 5 mg/ml zugegeben und für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von SDS *ad* 1% wurde erneut für 1 h bei 37°C inkubiert, bevor Proteinase K *ad* 50 µg/ml zugegeben und nochmals 1 h bei 37°C inkubiert wurde. Die Proben wurden zweimal mit PCI behandelt und gefällt.

DNA aus den Spirochaeten *Leptospira biflexa* und *Brachyspira hyodysenteriae* stellte Frau Dr. Isabelle St. Girons, Pasteur Institut Paris, und DNA aus *Treponema denticola* Herr Dr. Heuner, Klinikum Charité Berlin, zur Verfügung.

2.10.3. Primer-Verlängerung zur Ermittlung des Transkriptionsstartpunkts

Die Primer-Verlängerung wurde mit 10 µg RNA und dem Primer Ex1 (5'-CTG CCA AAT CCG TTA ATT GCT ACT CTA GTC ACG TT-3') gemäß Sambrook et al., (1989) durchgeführt. Der Hybridisierungspuffer enthielt 50 µg/ml Proteinase K, die nach der Hybridisierung durch Phenolisierung entfernt wurde.

2.10.4. Mung Bohne Nuklease Analyse (MBNA, mung bean nuclease protection assay)

Die für die MBNA verwandte, markierte Einzelstrang-DNA-Probe wurde wie folgt hergestellt. Einzelsträngige DNA (ssDNA) des Vektor pMS2.2A wurde mittels M13 Phagen erzeugt (Protokol [Sambrook et al., 1989]). Nach Binden des Primers Ex1 an die ssDNA des Vektors pMS2.2A erfolgte mittels Klenow-DNA-Polymerase die Zweitstrangsynthese unter Zugabe von α -³²P dCTP. Nach Zugabe von nicht radioaktivem dCTP wurde die Reaktion inaktiviert, gefällt und der Reaktionsansatz mit *Eco*RI verdaut. Das Präzipitat des Restriktionsverdau wurde nun auf ein 6% denaturierendes Polyacrylamid-Gel (PAA-Gel) geladen und der radioaktiv markierte Einzelstrang elektroeluiert.

10 µg *Synechocystis* RNA wurden mit ca. 20000 cpm der Einzelstrangprobe hybridisiert und dann mit 5-10 U Mung Bohne Nuklease verdaut. Nach Behandlung mit Proteinase K wurde

der Ansatz gefällt und mit einer Sequenzreaktion des Primers Ex1 auf einem 6% PAA-Gel getrennt und unter Verstärkerfolie bei -80°C exponiert.

2.10.5. Bestimmung von Chloramphenicolacetyltransferase (CAT) Aktivitäten in *Synechocystis*

Anzuchtbedingungen zur Bestimmung von Promoteraktivitäten mittels CAT sind in Marracini et al., 1994 beschrieben. CAT-Aktivitäten wurden, wie in Ferino und Chauvat, 1989 beschrieben, ermittelt. Auf eine Temperaturstabilisierung der Kuvetten wurde verzichtet. Quantitative Proteinbestimmung erfolgte nach Bradford, 1976.

2.10.6. Anreicherung von DNA-Bindeproteinen mittels Heparin-Sepharose Chromatographie und Gelretardationsexperimente

Aus *Synechocystis* Protein-Rohextrakten wurden mittels Heparin-Sepharose Affinitätschromatographie DNA-bindende Proteine angereichert. Hierzu wurden Bakterien aus 2 l exponentieller, autotroph angezogener *Synechocystis*-Kultur mittels Gefrierbruch aufgeschlossen und in Aufschlußpuffer aufgenommen (50 mM Tris HCl [pH 7,5]; 1 mM EDTA; 2 mM DTT; 0,5% Triton X-100; 1 mM PMSF; 10% Glycerin). Durch Zentrifugation bei 30000 g und 140000 g wurden unlösliche Bestandteile abgetrennt und der Überstand (ca. 40 mg Gesamtprotein) daraufhin auf eine äquilibrierte Heparinsäule (5 ml Hightrap Heparin, Pharmacia) geladen. Die Säule wurde mit 25 ml Äquilibrationpuffer (entspricht Aufschlußpuffer) gewaschen und dann mit einem 40 ml linearen 0-1 M NaCl Gradienten eluiert (Fraktionsvolumen 2 ml, Flußrate 2 ml/min). Erhaltene Fraktionen wurden über Nacht zweimal gegen Aufschlußpuffer (ohne PMSF) dialysiert, über Amicon 10 Säulen aufkonzentriert (ca. 10 x) und daraufhin im Gelretardationsexperiment auf Bindeaktivität getestet (2–10 µg Protein). Gelretardationsexperimente wurden entsprechend Current Protocols (Ausubel et al., 1987) in einem 6% nicht denaturierenden PAA-Gel im Tris-Glycin-Puffer-System (25 mM Tris HCl [pH 8,3];

190 mM Glycin, 1 mM EDTA [pH 8,0]) mit Klenow-endmarkierten DNA-Fragmenten durchgeführt.

2.10.7. Klonierung und Sequenzierung von GAPDH Genen

Degenerierte Primer für die beiden hoch konservierten Regionen an den N- und C-terminalen Enden der GAPDH Proteine (INGFGRI, WYDNE) wurden für die Amplifikation von *gap* Genen (95% der kodierenden Region) aus genomischer DNA genutzt. In den Polymerase-Ketten-Reaktionen (PCR-Reaktionen) wurden die folgenden Primer verwendet: G/AINFGF: 5'-GSNATHAAYGGNTTYGG-3' und WYDNE: 5'-AYTCRTTRTCRTACCA-3' (nicht kodierender Strang). Bedingungen für die PCR-Reaktionen waren im Fall folgender Spezies, *Gloeobacter violaceus*, *Prochloron didemni* und *Prochlorococcus marinus*, wie folgt: Zyklus 1: 93°C für 5 min; Zyklen 2-35: 93°C für 1 min, 50°C für 1 min und 72°C für 2 min; Zyklus 36: 72°C für 5 min.

Für die Spezies *Spirochaeta stenostrepta*, *Spirochaeta aurantia*, *Serpulina murdochii* und *Treponema saccharophilum* wurden folgende Bedingungen genutzt: Zyklus 1: 94°C für 3 min; Zyklen 2-35: 94°C für 30 sek, 50°C für 30 sek und 72°C für 1 min; Zyklus 36: 72°C für 7 min

Im Fall von *Leptospira biflexa*, *Leptospira interrogans*, *Leptonema illini*, *Brachyspira hyodysenteriae* und *Treponema denticola* waren die Bedingungen wie folgt: Zyklus 1: 96°C für 5 min; Zyklen 2-35: 96°C für 30 sek, 48°C für 30 sek und 72°C für 1 min; Zyklus 36: 72°C für 7 min.

Reaktionen wurden mit 40 bis 200 ng genomischer DNA und einer Mg²⁺ Konzentration von 1,5 mM durchgeführt. Amplifikate wurden mit Polynukleotidkinase und Klenow-Fragment behandelt (entsprechend der Protokolle des Zulieferers) und daraufhin in pBluescript-SK+ bzw. pUC18 kloniert. Im Fall jedes Gens wurden mehrere Klone mit der Kettenabbruchmethode (Pharmacia und Perkin Elmer) sequenziert und PCR-Fehler eliminiert.

Die Nukleotid-Sequenzdaten erscheinen in der DDBJ/EMBL/GenBank Datenbank unter folgenden „Accession numbers“: AJ007271, AJ007272 (*gap2* und *gap3* von *Prochloron didemi*); AJ007273 und AJ007274 (*gap1* und *gap2* von *Gloeobacter violaceus*); AJ245541 (*gap2* von *Prochlorococcus marinus* CCMP 1375); AJ245542 (*gap* Gen von *Spirochaeta aurantia* DSM

1902); AJ245543 (gap Gen von *Spirochaeta stenostrepta* DSM 2028); AJ245544 (gap Gen von *Treponema saccharophilum* DSM 2985); AJ245545 (gap Gen von *Serpulina murdochii* ATCC 51284); AJ245546 (gap Gen von *Leptospira biflexa* Patoc 1); AJ245547 (gap Gen von *Leptonema illini*); AJ245548 (gap Gen von *Leptospira interrogans* pathovar *icterohaemorrhagiae*); AJ245549 (gap Gen von *Brachyspira hyodysenteriae* ATCC 27164); AJ245550 (gap Gen von *Treponema denticola* ATCC 33521).

2.11. Phylogenetische Analyse der GAPDH Sequenzen

Alle in dieser Studie verwendeten GAPDH Sequenzen entstammen entweder Datenbanken oder Genomprojekten, die auf der TIGR Homepage zu finden sind.

Übersetzte Protein-Sequenzen wurden mit CLUSTALW (Thompson et al., 1994) in ein Alignment gebracht und per Hand nachträglich editiert. Nach Ausschluß von „gaps“ und Eliminierung der N- und C-terminalen Regionen inklusive GI und WYDNE enthielt das Alignment 107 Sequenzen mit je 296 Positionen. Ein phylogenetischer Baum wurde unter Verwendung der Kimura-Distanz-Abschätzung und des NJ-Algorithmus berechnet (Saitou und Nei, 1987; Thompson et al., 1994). Die statistische Signifikanz der Verzweigungen wurde durch 100 Bootstrap-Wiederholungen mittels der seqboot Option des Phylip Packets (Phylip3.5C) ermittelt (Felsenstein, 1989).

Für die Analyse zur Bestimmung der Position der GapA Sequenz aus *Euglena* (Kapitel 3.1.4.) wurde folgender Datensatz verwendet: *Anabaena variabilis* gap1, L07497; *Anabaena variabilis* gap2, L07498; *Anabaena variabilis* gap3, L07499; *Arabidopsis thaliana* GapB, M64115; *Arabidopsis thaliana* GapA, M64114; *Bacteroides fragilis* gap1, U27541; *Chlamydia trachomatis* gap1, U83198; *Chlamydomonas reinhardtii* GapAB, L27668; *Chondrus crispus* GapAB, X73033; *Chondrus crispus* GapC, X73036; *Gallus gallus* GapC, J00850; *Entamoeba histolytica* GapC, M89790; *Escherichia coli* gap1 (A), X02662; *Escherichia coli* gap, X14436; *Euglena gracilis* GapAB, L39772; *Euglena gracilis* GapC, L21904; *Giardia lamblia* GapC, P53429; *Gracillaria verrucosa* GapAB, Z15102; *Haemophilus influenzae* gap1, U32848; *Leishmania mexicana* GapC, X65220; *Pinus sylvestris* GapA, L26923; *Pisum sativum* GapA, X15190; *Pisum sativum* GapB, X15188; *Pisum sativum* GapC, L07500; *Pseu-*

Pseudomonas aeruginosa gap, M74256; *Pseudomonas aeruginosa* gap, *Pseudomonas* sequencing project; *Ralstonia eutropha* gap, U12422; *Rhodobacter capsulatus* gap3, M68914; *Rhodobacter sphaeroides* gap, M68914; *Synechocystis* PCC6803 gap1, X86375; *Synechocystis* PCC6803 gap2, X86376; *Treponema pallidum* gap1, AE001255; *Trypanosoma brucei* gapC, X53472; *Trypanosoma brucei* gapCg, X53472; *Ustilago maydis* GapC, X07879; *Xanthobacter flavus* gap, U33064; *Zea mays* GapA, X07157; *Zymomonas mobilis* gap, M18802.

2.12. Abkürzungen

ATCC	American type culture collection
bp	Basenpaar(e)
CAT	Chloramphenicolacetyltransferase
DCMU	3-(3,4-Dichlorophenyl)-1,1-Dimethylharnstoff
DBMIB	Dibromothymoquinon
DTT	Dithiothreitol
<i>gap/ Gap</i>	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase Gen in Bakterien/Eukaryoten
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
GapAB	plastidäre GAPDH
GapC	cytosolische GAPDH
GC	Guanosin/Cytosin (Gehalt)
h/min/sek	Stunde(n)/Minute(n)/Sekunde(n)
HL	Starklicht-Bedingungen
IHF	Integration host factor
kb	Kilobasenpaar(e)
NAD(P)H	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
ng	Nanogramm
NJ	Neighbor-Joining Methode
OD	optische Dichte
RbcLS (rubisco)	Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase; große (L) und kleine (S) Untereinheit
PAA	Polyacrylamid
PCC	Pasteur culture collection
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
SL	Standard-Lichtbedingungen
Vol	Volumen

3. Ergebnisse

3.1. Etablierung von GAPDH Sequenzen und deren phylogenetische Analyse

3.1.1. Klonierung von partiellen GAPDH Genen aus Cyanobakterien und Spirochaeten

Die nächsten noch freilebenden Verwandten der Plastiden sind unter den Cyanobakterien zu finden (siehe Einleitung 1.2.). Bisher waren nur GAPDH Sequenzen der Cyanobakterien *Anabaena variabilis* (ATCC 29413) (Martin et al., 1993), *Synechocystis* PCC6803 (Koksharova et al., 1998) und *Synechococcus* PCC7942 (Schubert, 1997) bekannt und damit aufgrund dieses limitierten Datensatzes das Bild cyanobakterieller Verwandtschaftsbeziehungen unvollständig. Um einen genaueren Einblick in die cyanobakterielle Phylogenie zu erhalten, wurden Gene aus drei weiteren Cyanobakterien mittels PCR amplifiziert, kloniert und sequenziert. Aus *Prochloron didemni* (*Prochloron*) und *Prochlorococcus marinus* (*Prochlorococcus*) konnte jeweils ein *gap2* Gen und aus *Prochloron* ein *gap3* Gen kloniert werden. *Gloeobacter violaceus* (*Gloeobacter*) besitzt ein *gap1* und *gap2* Gen. Im Falle von *Gloeobacter* wurde mittels genomischer Southern Hybridisierungen der Nachweis erbracht, daß die klonierten Gene auch tatsächlich dem zugeordneten Organismus entstammen (nicht gezeigt). Im Labor von Dr. Wolfgang Hess, FU-Berlin, konnte gezeigt werden, daß eine *Prochlorococcus gap2* Sonde spezifisch mit einem ca. 315 kb großen *Prochlorococcus* NotI-Fragment hybridisiert. Im Fall von *Prochloron* konnten entsprechende Kontrollen aufgrund der geringen zur Verfügung stehenden Menge an DNA nicht durchgeführt werden.

In dieser Arbeit durchgeführte phylogenetische Analysen der in den Datenbanken vorhandenen GAPDH Sequenzen deuteten eine nahe Verwandtschaft einer GAPDH Sequenz aus der Spirochaete *Treponema pallidum* und GAPDH Sequenzen der Euglenozoa an. Um den GAPDH Datensatz aus Spirochaeten zu erweitern und damit eine genauere Klärung der Herkunft dieses *gap* Gens zu ermöglichen, wurde aus den folgenden neun Spirochaeten jeweils ein *gap* Gen mittels PCR amplifiziert, kloniert und sequenziert: *Leptonema illini*, *Leptospira biflexa*, *Leptospira interrogans*, *Serpulina murdochii*, *Brachyspira hyodysenteriae*, *Spirochaeta aurantia*, *Spirochaeta stenostrepta*, *Treponema denticola* und *Treponema saccharophilum*. In allen Fällen wurde mittels genomischer Southern Hybridisierungen der Nachweis erbracht (nicht gezeigt), daß die klonierten Gene tatsächlich aus dem entsprechenden Organismus stammen.

3. Ergebnisse

Abb. 3.

Spirochaeten

Proteobakterien

Cyanobakterien

Gram-Positive mit hohem GC

Gram-Positive mit niedrigem GC

Andere eubakterielle Phyla

Eukaryoten

0.1

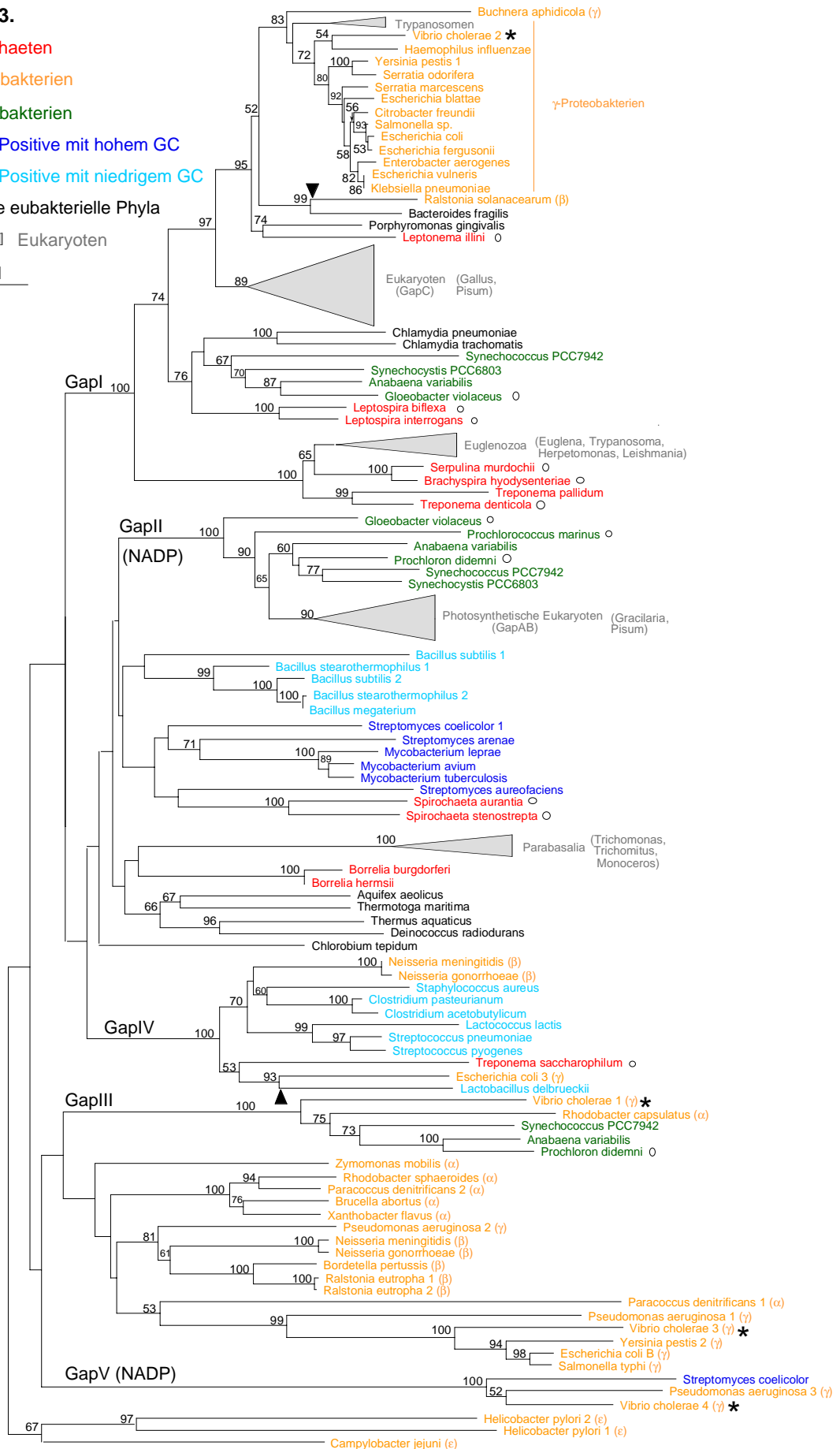


Abb. 3. Phylogenetischer Baum eubakterieller GAPDH Sequenzen zusammen mit repräsentativen GAPDH Sequenzen aus Eukaryoten. Zur Berechnung des Baums diente die Neighbor-Joining (NJ) Methode unter Verwendung einer Kimura-Distanz-Matrix. Bootstrap-Werte wurden für die NJ-Topologie (100 Wiederholungen) berechnet und sind, sofern sie 50% übersteigen, entsprechend oberhalb und unterhalb der Verzweigungspunkte im Baum eingetragen. Der Balken entspricht einer Substitutionsrate von 0,1 Substitutionen pro nicht identischer Aminosäureposition. Gentransferereignisse sind durch schwarze Dreiecke gekennzeichnet. Sterne bezeichnen die Position der vier GAPDH Gene in *Vibrio cholerae*. Alle in dieser Arbeit ermittelten GAPDH Sequenzen sind durch Kreise bezeichnet. Das Auftreten von Eukaryoten ist durch graue Dreiecke angedeutet, deren Größe auf die Menge an bekannten Sequenzen hinweist. Die in der Analyse verwendeten repräsentativen eukaryotischen Gattungen sind hinter den Dreiecken aufgelistet. Die entsprechenden Speziesnamen dieser Eukaryoten sind wie folgt: Eukaryoten GapC: *Pisum sativum*, *Gallus gallus*; Euglenozoa: *Euglena gracilis*, *Trypanosoma brucei*, *Leishmania mexicana*, *Herpetomonas samuelpessoai*; Photosynthetische Eukaryoten: *Pisum sativum* GapA, *Gracilaria verrucosa*; Parabasalia: *Trichomonas vaginalis*, *Trichomitus batrachorum*, *Monoceros sp.*; Trypanosomen: *Trypanosoma brucei*.

3.1.2. Phylogenetische Analyse von GAPDH Sequenzen

Insgesamt 107 GAPDH Sequenzen aus 74 Eubakterien und 11 Eukaryoten wurden in die phylogenetische Analyse einbezogen, deren Ergebnis in Abb. 3 dargestellt ist. Ausgehend von 296 Positionen wurde eine Distanz-Matrix (Kimura-Korrektur) erstellt und zur Konstruktion eines phylogenetischen Baumdiagramms mittels der Neighbor-Joining (NJ) Methode verwendet. Als Konfidenzkriterium für die ermittelte Topologie diente eine Bootstrap-Analyse, die 100 Wiederholungen umfaßte. Die erhaltenen Bootstrap-Werte sind an den entsprechenden Verzweigungspunkten des Stammbaums (siehe Abb. 3) eingetragen.

Da im allgemeinen die Nomenklatur von Genen bzw. Proteinen nicht auf phylogenetischen Kriterien, d. h. nicht auf der Homologisierbarkeit mit verwandten Vertretern beruht, sondern speziesspezifisch erfolgt, kommt es in einigen Fällen zu Mißverständnissen, die auf der Verwendung einer Genbezeichnung für mehrere Gene unterschiedlicher Spezies (z. B. *Bacillus subtilis* *gap1* und *gap1* Gene aus Proteobakterien) beruhen. Um solche Mißverständnisse zu vermeiden, wird hier eine operationale GAPDH Nomenklatur eingeführt. Diese orientiert sich

an den aus der phylogenetischen Analyse resultierenden Untergruppen, die deutlich durch einen Bootstrap-Wert von 100% voneinander getrennt sind und bezeichnet diese entsprechend als Typ Gap-I bis Gap-V.

Der Gap1/GapC (Gap-I) Teilbaum beinhaltet eine Gruppe von γ -proteobakteriellen (enterobakteriellen) Sequenzen, der auch GAPDH Sequenzen aus Trypanosomen angehören. Daneben enthält der Gap-I Teilbaum auch eine β -proteobakterielle GAPDH Sequenz aus *Ralstonia solanacearum* (*Ralstonia*) und die eukaryotischen, cytosolischen GapC Sequenzen, die mit großer Wahrscheinlichkeit mitochondrialen und damit α -proteobakteriellen Ursprungs sind (Martin et al., 1993; Henze et al., 1995; Martin und Schnarrenberger, 1997). Eine Gap Sequenz aus *Bacteroides fragilis* (*Bacteroides*), das dem bakteriellen Phylum Cytophagales (Paster et al., 1994) zugeordnet wird, befindet sich zusammen mit dem β -Proteobakterium *Ralstonia* an einem gemeinsamen Ast, der durch einen hohen Bootstrap-Wert (99%) unterstützt wird. Auf einem weiteren Ast der β/γ -proteobakteriellen Gruppierung befindet sich eine Sequenz aus *Porphyromonas gingivalis*, das ebenfalls dem Phylum Cytophagales angehört und eine Sequenz aus *Leptonema illini*, das dem Phylum Spirochaetales zugeordnet wird. Die cyanobakteriellen Gap1 Sequenzen von *Synechocystis*, *Synechococcus*, *Anabaena* und *Gloeobacter* zweigen vor den proteobakteriellen Sequenzen vom Gap-I Baum ab. Assoziiert mit den cyanobakteriellen Sequenzen sind noch zwei weitere Äste, die zum einen Sequenzen der Chlamydien *Chlamydia trachomatis* und *Chlamydia pneumoniae* und zum anderen der Spirochaeten *Leptospira biflexa* und *Leptospira interrogans* tragen. Die GapC Sequenzen der Euglenozoa befinden sich zusammen mit Gap1 Sequenzen der Spirochaeten *Treponema pallidum*, *Treponema denticola*, *Brachyspira hyodysenteriae* und *Serpulina murdochii* an einem Seitenast, der an der Basis des Gap1/GapC Baums abzweigt und deutlich (100% Bootstrap-Unterstützung) von diesem getrennt ist.

Der Gap2/GapAB Baum beinhaltet ausschließlich GAPDH Sequenzen von Cyanobakterien (Gap2) und photosynthetischen Eukaryoten (GapAB). Nur die basale Abzweigung der Gap2 Sequenzen aus *Gloeobacter* und *Prochlorococcus* wird unter den cyanobakteriellen Sequenzen deutlich unterstützt, alle anderen Verzweigungen erhalten keine hohe Bootstrap-Unterstützung.

Der Gap-III Teilbaum beinhaltet Sequenzen aus den Cyanobakterien *Synechococcus*, *Anabaena* und *Prochloron* und zudem aus *Rhodobacter capsulatus* und *Vibrio cholerae*, die entsprechend den Subphyla α - und γ -Proteobakterien angehören. Paarweise Vergleiche der Aminosäure-Sequenzen der beiden proteobakteriellen Sequenzen mit cyanobakteriellen Gap3

Vertretern ergeben Identitäten, die sich zwischen 58% und 63% bewegen und damit vergleichbar mit den Identitäten zwischen Gap3 Sequenzen aus *Prochloron* und *Synechococcus* (65%) sind. Die Äste sind in dieser Untergruppe generell sehr lang, was vermutlich auf einer erhöhten Evolutionsrate dieser Sequenzen beruht.

Mit dem Gap-III Teilbaum sind zwei weitere Gruppierungen lose assoziiert. Eine sehr schnell evolvierende Gruppierung (an der Basis, durch 53% Bootstrap-Wert getrennt) beinhaltet die *E. coli* GapB Sequenz, die Erythrose-4-phosphat Dehydrogenase Aktivität besitzt (Zhao et al., 1995), und einige nahe verwandte proteobakterielle Sequenzen. Da sowohl der Gap-III Teilbaum als auch diese Gruppierung Sequenzen aus dem γ -Proteobakterium *Vibrio cholerae* beinhalten (in Abb. 3 durch Stern gekennzeichnet), handelt es sich vermutlich auch hier um Teilgruppen paraloger Gene, selbst wenn sie nicht durch hohe Bootstrap-Werte voneinander getrennt sind.

In der anderen Gruppierung, die mit Gap-III lose assoziiert ist, findet man vergleichsweise langsam evolvierende Sequenzen aus β/γ - und α -Proteobakterien, deren Topologie im Einklang mit der des Referenzsystems, der kleinen ribosomalen RNA, ist (Woese, 1987). In dieser Gruppe inbegriffen ist auch eine Gap Sequenz von *Rhodobacter sphaeroides*, die nur 44% identische Aminosäuren mit der Gap3 Sequenz aus *Rhodobacter capsulatus* besitzt. Eine vergleichbar hohe Divergenz besteht auch zwischen den beiden *Paracoccus* Sequenzen (43% Identität), die sich in den beiden mit Gap-III assoziierten Gruppierungen befinden. Zusammenfassend kann man feststellen, daß der Gap-III Teilbaum wesentlich divergenter als die Teilbäume der Gap-I und Gap-II Sequenzen ist.

Im Gap-IV Teilbaum befinden sich Sequenzen aus drei verschiedenen bakteriellen Phyla, Proteobakterien, Gram-Positiven mit niedrigem GC-Gehalt und Spirochaeten. Die Sequenzen sind in diesem Teilbaum nicht entsprechend ihrer phylogenetischen Verwandtschaftsbeziehungen verteilt. Proteobakterien finden sich zweimal mit Gram-Positiven assoziiert, wobei ein Ast, der die Sequenzen aus *E. coli* und *Lactobacillus delbrueckii* trägt, besonders hohe Bootstrap-Unterstützung bekommt (93%). Der Gap-IV Teilbaum beinhaltet auch die Sequenz aus der Spirochaete *Treponema saccharophilum*.

Im Gap-V Teilbaum befinden sich Sequenzen der γ -Proteobakterien *Vibrio cholerae* und *Pseudomonas aeruginosa* und eine Sequenz aus dem Gram-Positiven mit hohem GC-Gehalt, *Streptomyces coelicolor*. Alle diese Sequenzen besitzen einen gemeinsamen extrem langen Ast.

Neben diesen klar erkennbaren Teilbäumen gibt es noch eine Reihe weiterer lose verbundener Teilgruppierungen. Besonders sei hier auf die Präsenz von vier weiteren Sequenzen aus dem Phylum der Spirochaetales hingewiesen, von denen zwei im Rahmen dieser Arbeit kloniert wurden. Diese beiden GAPDH Sequenzen aus den Spezies *Spirochaeta aurantia* und *Spirochaeta stenostrepta* sind lose mit einer Gruppierung assoziiert, in der sich ausschließlich Sequenzen aus Gram-Positiven befinden, die sowohl hohen als auch niedrigen GC-Gehalt besitzen und sich entsprechend ihres GC-Gehaltes in zwei Gruppierungen aufteilen. Die niedrig GC-Gruppierung enthält ausschließlich Sequenzen aus *Bacillus* Spezies, die in *B. subtilis* und *B. stearothermophilus* vermutlich rezenten Genduplikationen entstammen. Die anderen beiden spirochaetalen GAPDH Sequenzen aus den Organismen *Borrelia burgdorferi* und *Borrelia hermsii* sind lose mit den eukaryotischen GAPDH Sequenzen der Parabasalia assoziiert. Eine schwach unterstützte (66%) Gruppierung beinhaltet Sequenzen aus drei thermophilen Organismen: *Aquifex aeolicus*, *Thermotoga maritima* und *Thermus aquaticus*, wobei sich letzterer an einem deutlich unterstützten Ast mit *Deinococcus radiodurans* befindet, mit dem er offensichtlich auch nahe verwandt ist (Eisen, 1995; Rainey et al., 1997; Huang und Ito, 1999).

3.1.3. Sequenzanalyse

Die GAPDH Sequenzen der neun Spirochaeten wurden mit weiteren GAPDH Sequenzen aus repräsentativen Pro- und Eukaryoten in ein Alignment gebracht und paarweise Aminosäure-Identitäten ermittelt (Abb. 4). Auffallend ist insbesondere die hohe Identität der Gap1 Sequenz aus *Brachyspira hyodysenteriae* mit Sequenzen der drei Euglenozoa, (*Euglena*, *Trypanosoma brucei* und *Herpetomonas sp.*) und den GAPDH Sequenzen aus den Spirochaeten, *Serpulina murdochii*, *Treponema denticola* und *Treponema pallidum*, die mit Ausnahme von *T. pallidum* (67%) über 70% liegen (Abb. 4). Die GAPDH Sequenzen aus diesen vier Spirochaeten und den Euglenozoa setzten sich deutlich von anderen Gap1 Sequenzen ab. So besitzt die Gap1 Sequenz aus *Brachyspira hyodysenteriae* jeweils nur 57% Identität mit Gap1 Sequenzen aus den Spirochaeten *Leptospira biflexa* und *Leptonema illini* und auch mit anderen Gap1 Sequenzen werden nicht mehr als 60% erreicht (nicht gezeigt). Ein weiteres gemeinsa-

3. Ergebnisse

```

      10      20      30      40      50      60      70
1  -----INGFGRIGRMVFRAVVEQN---RN-VEIVGINDLLD-AEYMAYMLRYDSTHGRFTGDVKVEGG-----QLIVNGKK---IRVTA
2  ....MTIKVG.....L....AQT....SDI...A...I...V.....K...V...N.T.E.KD-----A-----
3  ....MTIKVG.....I....AQ--K---SDI...A.....D.....K.....D.T.E.KD-----H.....
4  .....A.A---FKDI.V.A.....E.PD.LV...K...V...D.E.A.D.N-----T.....L..

5  -----INGFGRIGRLVLRSGIK-D---PNLEFVAINDLVT-PDNL SylFKYDSTHGRFDGDVSHSTDN-----EIIIDGKK---VKTFS
6  .....F.A.....A.L.....Q.T.E.EK-----L.V.....ILCV.
7  MTTWDLAMRIV.....QIL.RN---SPI.V.....A.G.L.T.....S.APQATFS.G-----CLVMGER----IRFLA
8  ....AKLVKG.....A..N.N---I..G...P...A..L.....KLR SQ.EAK.D-----G.V...HF---IPC.V.

9  -----INGFGRIGRLVFQALVERGLLGK-EIEVVGVDVSTDAKYFAYQLKYDSVHGRMKADITTEGE-----DVLVVNGNK---IKCIG
10 .....D.....Q.....SH.....K
11 .....NQN....DKFD.A..L.....Q.K.D.K.G.D-----H.....S
12 .....MRVA.....L.MA.QK....FD.AA..L...R.....Q.K.GSSL SAPA.....I.E.G.HR---VC
13 .....MTIKVG.....M....CDD...N...D.A..MN..R...M.....KF.HSVS.TKS KPSV-AKDT.....HR---L.VK
14 ...MAPKIG.....M....CDQ...T.TFD.....MA..D...M.....KF.HTVS.KKSDANL-AEA.II...HE---M
15 ...MAPVKVG.....M..MC.Q.V...DFD..A..M..E.....M.....KP.YTVEVAKS SPSV-KKP.....HR---Q.VK

16 -----MKLAINGFRIGRNVFKIAFERG-----IDIVAINDLTD-PKTLAHL LKYDSTFGVYNKKVESRDG-----AIVVDGRE---IKIIA
17 .....L..RAIR..Y---AKDCQV...H..C..LR.NV.....AH.RFQDELKIAD-----D.FT.GSGADMWTV.SVG
18 .....L..RACRKLY---PKDIQV...H..G..I..NVY.....TAHRAFPEP.TVDEAK-----QEFT.GEGADKWV.V.S.G
19 .....L..RAVRRLY---PTECQ...H..C..I..NV.....TAHRSFGE.I.ITGA-----DTFT.GEGSNVWTV.C.G

20 -----NGFGRIGRLAFRQMFAD---GY-EVVAINDLTK-PSMLAHL LKYDTAQGGYCGKVGENLHTVSADDEAGTITVDGKV---LKIYA
21 .....MSKVGI.....VLGRLL EVK---SNID.....S..LI..Y..H.SNY.PFPWS.DFTED-----SLI...S---IAV..
22 .....MTVKIGI.....RIMDLGEETK-DI.....T..A.....STH.TFDHE.SATED-----SLV...K---YRV..
23 .....MTKVAI.....L.RILEVP-L-----D.AK....F...SS..RFN.EIEVKEG-----AFV.N..E---V.VF.

24 -----NGFGRIGRNVLRALGVP---GLRIVAVNDLTD-SATLAHL LKHDSILGNLSVPVTAGPG-----VITVDGQD---IKVFA
25 .....I.....T.....N-----GIE.....ASV.....A...Y.A.PAK.E.VN-----A.L.N.KR---A.Y.
26 .....MTRIAI.....D.V..VDV.A.A...L.D.TAR-----SD.DV.....E.P...R..AY.TTS.R.GR...VEGN-----LV...RR---T.T.
27 .....MTVRVGI.....FY..L.AQQEQGTADVEV..A..I...NS.....F....R.PCD.GLEGDD-----T.V.GRAK---.AL.
28 .....MKVKVAI.....M.F.K.MLDD---QIQV..I.ASYS.AE....I.Y.T.H.RYDKE.V..ED-----SLI.N.KK---VLLN
29      GR                                D

      80      90      100      110      120      130      140      150
1  ESD---PANLKWNEI-GAEYVIESTGLFTTLEKTQ-----AHLKAG-AKKVVISAPS-AD-----APMFVMGVNHS SYKND-MDIVSNASCTTN
2  .KN---D...DQV..V...V.....L.K..SE-----A...Y..M...KD-----T...C...TDK.VKG.TK.....
3  .R---D...D.V..V...L.D.TAR-----K.IT...R...MTG..KDN---T...K.A.FDK.AG-.Q.....
4  VK---E...G.V...DV.V...I.L.K.GA-----K.ID.....IM...KD-----T...Y...GT..G-.EA.I.....

5  ERD---PEKL PWKEL-GVDFVIESTGLFTDRVGAE-----KHIKAG-AKKVVISAPAKDKD---IPTFVMGVNHEKYDSAKDNVSNASCTTN
6  .....D..K..Y.....N.....NPSN.HI.....
7  .K---VQ...D..D..V.V...VN.DD.A-----LDS...R.L.T...G---V...QQF.P..VII.....
8  V.N---AE...GK...A.Y.V...SE..S-----LQ...R.I...T..P.R---VR.LLV...DLF.PS..VI.....

9  ATK--ELKDL PWKAL-GVEYVIESTGLFTEKEKAE-----GHIAAG-AKKVIISAPGKGD---LRTFVYGVNHEEYDPANHHVSNASCTTN
10 .APLNQ.EQ...D...F.....Y.....K.....
11 GKGL-TPAQ...E...IDV.....IY.N...Y-----E.LE.....SKDPAKPIK...M..EN..KASE.....
12 GRGL-KPSQ...D...I.V...A.IYAN..SSY-----LE...R.....A.SSDASKPVK.I.M..EH.F...E.K.....
13 .QR--NPA...GK.....V.SA-----LRG...R..V...AS.G---AK...M...NN.N.REQ.....
14 .R--NPE...GK.....V.....AD..R-----L.K.....K.I.M...T..QAS-MD.....
15 .QR--NPA...SK.....N.A-----LKG.....AS.G---AK.I.M..NQ..N.SS.S.....

16 ERD---PKNL PWAKL-GIDVVIESTGVFSSATSDKGG-----YLDHVN HAGAKKVILTPAKDE---IK-TIVLGVNDHDIN-SDLKAVSNASCTTN
17 G.IG--.SQ...E..KV...L...I.RTKMVL.ADGSVEKDG.DG.LKAG...V.S..SA.E---IEC.L...NE.LKK-ETSCI.....
18 G.LG--.SQ...KE.....L...I.RTKAEKDAEGKIKKDG.DG.LVSG...V.S..SA.E---IEC.L...E.LKP-ET.CI.....
19 G.LG--.SE...GE...V...L...I.RRHLTK.ADGSVDKDG.DG.IVSG...R.V.S..SA.E---IEC.L...E.FTA-AV.C.....

20 EKE---AKNCPWKEL-NVDVVLECTGFYCKKELAQ-----QHIDAG-ARKVVISAPAGND---LPTIVYVNVN HKTLTKN-DNIISAASCTTN
21 .....I...AK.GAEIIV.....TSP.KS-----A.L...K..L.....E---MK.....DD..DG...T.V.V.....
22 .PQ---Q.I..VKNDG..F.....TS.AKS-----A.L...KR.L.....K...S.QD...AD..T.V..G.....
23 .AD---PEKL..G...GT.....FT...K.E-----A.VR...K.....K...F...NED.DGT.ETV..G.....

24 ERD---PGLIPWSSV-GVDVVI EATGRFAEKDKAE-----VHITKGGA KRVIISAPAKGD---DLTIVMGVN HQNYDPAKHRVSNGSCTTN
25 .E---N...AKE...L.V.S...T.RA-----A..S.....EGR...L.H.....
26 .E---ANL..AEL...I.L...TSAKA.R-----A.LDA...K.LV...D.A---I.LAF...TDA...DL.TI...A...
27 V.EG---AAL..GDL...V.S..L.TNAA..K-----G.LDA...K...TDE---I..L...DDK.-GSQNII..A...
28 S....KQL..REY.DI.I.V...K.NA...M-----G.EA...K..LT..G.NE---V...EDQF.AER.VII..A....
29      W      E TG      H      A      V      P      N      S      SCTTN
```

3. Ergebnisse

```

160      170      180      188P      200      210      220      230      240      250
1 CLAPITKVINDR-WGVEEGLMTTVHAVTATQKTVDGP-SKKDWRGGRGAYQNIIPSSGAAKAVGKVIPELAGK-LTGMSFRVPTSNVSVVDLTVRLK-K
2 ...A..L..N..MVG...T...A...A.GG...LD...N...LD...CQ.A..
3 ...LA...N.F.II...T...H...S...L..N...A...P...E..
4 ...VA..L..K...IKR...A...N...ILE...V...NK...D...E.E..

5 CLAPITKVVLND-FGIVEGLMTTIHAMTATQPTVDGP-SKKDFRGRGAAQNIIPASTGAAKAVGLCIPEVNGK-LTGMSFRVPTPDVSVVDLTVRTE-K
6 ...V...W..E...T...M...
7 ...LA..L...E...V..A..SV...R..W...F...L..LK...A...VA...KLS.S
8 ...A..IN...LT...V...W...S...A.VL..LK...A...I...FK.A..

9 CLAPIVHVLKEGIGIETGLMTTIHSYTATQKTVDGP-SKKDWRGGRAAACNTIPSTTGAAKAVGEVLPATKKG-LTGMSFRVATPDVSVVDLTVRSE-K
10 ...L...V...S...
11 ...V...F...A...V..L...V..I...T...P..TG...I..T...
12 ...V...F...V...V..L...V..I...S..R...A...P..TG...T...
13 ...L...V...F..S...V...V..V...M..I..S..Q...A...P..A...IAT.R
14 ...L...V..V.K...A...I..I...V...A...P...LA..
15 ...L...F..V...V..L...M..I...V...P...TAA..
16 CLAPLAKVLHES-FGIEQGLMTTVHAYTNDQRILDLP-HSDLRRARAALSIIPTSTGAPKAVGLVLPKLGK-LNGTSMRVVPVPTGSIVDLTVQLKKK
17 ...V...T.M.H..E.IN.F...S...VVA.TV--K...S..VNM...AI.LPK.VHA.PP.SMD.L.I...TV...V..NV..
18 ...G.V..T.NNA...RN.F...S...VVA.TM--K...GMN...AI.LPK.CHG.PP.S.D.FAL..TI...L...NVN-A
19 ...VT..INDQ..KVLN.F...S...VVS.VM--A...MN...AI.LPR.VKA.PP.SMD.L.L...TI...L..V.FNVE..

20 CLAPMAKALNDY-APIQSGIMSTIHAYTGDQMILDGPHRKGDLRRARAGAANIVPNSTGAAKAIGLVPELNGK-LIGSAQRVPTPTGSTTMLFAVVKKG
21 ...H.S-FG.EV.T.T...T.SLV...GK..AS..A.E..I..HT...S...K.H...VK...V.E.YRFS--E
22 S...N...KE-FG..V.T.T...AT.KV...D.GNNF.N...A.E..I..H...L...D.H...VKD..E.E.VTILD-
23 ...V...K-FG.EK.F.T...N..NT...F...A.VS..I...AQ...K...D.N...V...V.E.IS.L..

24 GLAPAAVLHEA-FGIEHGLMNTTHAYTNSQVLHDQP-EKDLRGARAASLSIVPYSSGAAKAIGKVIPLDGGK-LTGYSRLVPVPVSVVDLTVTVS-K
25 A...L.R...DT..R...Q.M...A...--AV..I..T...E...L..A.F...R.G-R
26 A...L.K..DDL-A...F.T.V...QE.N.Q.G--HR.P.R...AVN...TTT...L.L.N...S.D.I...G...E.NT..A-R
27 C...L.K..DDE--VK...T.I...QD.N.Q.G--H...R...A.N...T.T...L.M.Q.K...D..A...I..TG.VT...DL..T
28 C...VVK..D.E...S...T.V...D.KNI.N--H...R...CGE..I..TTT...LSL.L.H.K...H.LA...N..L..V.DLK-T
29 L P          G M T H T Q D          R R          P G A A          G R V S

260      270      280      290      300      310      320      330
1 PAKYEDICKAMKEESE-GAMKGVLYGTDEEVVSNDFLHDARTSIFDAKAGIQLS-----DTFVKVVSWDYNE-----
2 ...A...KA...EL..I...S..IGET..V...A.T-----I...IGYSNKVLDLIAVMKAVNA:....
3 A.T..Q.KA.V.AAA--E...EDD..T..NGEVC..V...A.N-----N...L...TGYSNKVLDLIAHISK:....
4 A.T.DE..AE..AQ...L...EDK..AT..RG...E...A.D-----G..I...

5 PTSLAEIKKMKKEASE-GSMKGILGYTEDMVVSNDFLGDIRSSIFDADACIELS-----PTFFKLVSWDYNE-----
6 E...K..SA...A...A...VSSTL...M...N-----SR...
7 A.TYEA.CEAV.H.AN-T..N.MY...EA...S..I..CEY...G.GVA.N-----DR...A...IGYATRIVDLLEVQENSK:....
8 A..YK...CAA..Q...LA...DEE..T..Q..TH...G.G..N-----SN...V.A...WGYSNRVVDLMLSMIQEQLAIV:..

9 ETSIKEIDVLMMKASE-TYLDKILGYCNEELVSSDFIHDSRSSIYDSLATTQNNLKDE-KRFFKIVSWDYNE-----
10 ...A...M.GV...D...N...
11 D...E...KAI...S...GV.A..D..I..T..I..PH...K..L...PG...L...
12 ...VADLNAML...S..RGV.Q..D.DI..A.V..NQY...R..L...PN...V...WGYSNRVVDLLKPFISQKR:....
13 D...AAL.R..K...M.N...TD...A...S...K..L...PN...R...WGYSNRVVDLVRHMAARDRAAKL:..
14 D...S.L...Q...G...FTD...T..V..N...L...PG...L..V...WGYSNRVVDLLKHMMSGN.
15 D...EAF.R..K...M.G..S.TD...YNNNN...K..L...PG...V...WGYSNRVVDLLKHMMSGN.

16 DVTKEEINSVLKASEPELKGILGYTEDPIVSSDIKGNHSPISVDGLETMVLEN----GFAKILSWDYNEFGYSTRVVDLAQKLK:-----
17 AC.VA.V.AA.KA.T.SGP.V..MK...T..ISDPYS...SQC.K.IP.PAG-GSLV.V...
18 K...V.AA.K..T..EGS...MT.VT...I..CQYS...A.S.K..P.PEGQGTLV.V...WM..C.CA.IFHR.E.YL:....
19 A...V.NA.KA.C...A...MKF.M...IDDN.S...S...P.PKG-GSLV.V...

20 DITKEGINAAMKAAAT-----ESFGYNEDQIVSSDIIMRFGSLFDATQTMVSKIDDD-TYQVEVVSWDYNE-----
21 KV.A.EV.N.L.Q.T-----NN...TDEE...SH...V...EITAVG..LQL.KT.A...YGFVTQLIRTLEKFAKL:....
22 KV.A.EV...KYES-----P..A..A...T.VL..TA..I..P...Q.ITAG--KQL.KT.A...YSFTCQMVTRTLHFATL:....
23 NV.V.E...E..N-----T..E..A.VV.ISY...L.KIVDV.G--SQL.KT...MSYTSQVLVRTLEYFAKIAK:....

24 DVTVEEVNAAFKAAEGLPLQGLGYSEEPLVSSDYQGDPRSSIVDALSTLVIG----KRMVKILAWDYNE-----
25 .T.AA...A.S.A...R...A..R..D...L...T-----G...V..S...
26 ...RD..LD.Y.A..Q...A.V.E..D...IT.N.A..F.SEL.R.D-----HI.VV...WGFSNRVIDTLQLLAAR:....
27 RAS.D.I...KA...R.K..K.YDA.I...IVT..H...F.SGL.K..D-----DQA.VVS...WGYSNRVIDLVTLVGKSL:....
28 ...A...E..KR..K-TSMY.V.D..D...T..NTN.H.AVI.G.T.M.ME----D.K..V...WGYSNRVIDLIRHVAARMKHPSAV:
29          V D          D
```

3. Ergebnisse

1	1.Leptonema illini	Gap1	100					
2	2.Porphyromonas gingivalis	Gap1	75					
3	3.Escherichia coli	Gap1	71					
4	4.Burgholderia solanacerarum	Gap1	70					
5	5.Leptospira biflexa	Gap1	64	100				
6	6.Leptospira interrogans	Gap1	63	85				
7	7.Chlamydia trachomatis	Gap1	55	62				
8	8.Anabaena variabilis	Gap1	60	68				
9	9.Brachyspira hyodysenteriae	Gap1	57	57	100			
10	10.Serpulina murdochii	Gap1	58	58	93			
11	11.Treponema denticola	Gap1	57	55	75			
12	12.Treponema pallidum	Gap1	49	49	67			
13	13.Trypanosoma brucei	GapC	55	54	72			
14	14.Euglena gracilis	GapC	57	56	78			
15	15.Herpetomonas	GapC	56	53	74			
16	16.Borrelia burgdorferi	Gap	44	47	56	100		
17	17.Trichomitus batrachorum	Gap	39	40	38	50		
18	18.Trichomonas vaginalis	Gap	40	41	40	53		
19	19.Monoceros sp.	Gap	38	40	40	53		
20	20.Treponema saccharophilum	Gap	40	44	38	49	100	
21	21.Escherichia coli	Gap	45	43	44	47	58	
22	22.Lactobacillus delbrueckii	Gap	43	44	41	46	59	
23	23.Clostridium pasteurianum	Gap	47	50	45	54	61	
24	24.Spirochaeta aurantia	Gap	44	48	48	55	45	100
25	25.Spirochaeta stenostrepta	Gap	45	48	47	53	45	75
26	26.Steptomycetes aureofaciens	Gap	44	44	45	52	48	56
27	27.Mycobacterium tuberculosis	Gap	46	49	48	54	52	55
28	28.Bacillus subtilis 1	Gap	43	42	44	55	44	52
29	Konsensus							

Abb. 4. Alignment von GAPDH Aminosäuresequenzen aus Spirochaeten mit entsprechenden Homologen aus Eubakterien und Eukaryoten. Die sechs getrennten Blöcke entsprechen den sechs Gruppierungen, in denen spirochaetale GAPDH Sequenzen vorkommen (Abb. 3). Nur jeweils eine spirochaetale GAPDH Sequenz ist vollständig ausgeschrieben. In allen anderen Sequenzen erscheinen identische Aminosäuren als Punkte und abweichende als Buchstaben. Aminosäuren sind entsprechend dem anhand der dreidimensionalen Struktur von *Bacillus subtilis* GAPDH entwickelten System nummeriert. P188 (blau gekennzeichnet) weist darauf hin, daß ein Prolin an dieser Position die Kofaktorspezifität auf NAD beschränkt, wohingegen andere Aminosäuren eine doppelte Kosubstratspezifität von NAD und NADP zulassen (Clermont et al., 1993). Eine Ausnahme bildet die glykosomale GapC Sequenz von Trypanosomen (Sequenz 7), die ein Valin an Position 188 besitzt, aber strikt NAD-spezifisch ist (Misset et al., 1987). Ebenso besitzen die Gap1 Sequenzen aus *Treponema pallidum* und *Treponema denticola* (Sequenz 11 und 12) ein Valin, GapC aus *Euglena* (Sequenz 6) dagegen besitzt an dieser Position ein Prolin. Insertionen an den Positionen 23A-23D, 163A und 301A-301D sind spezifisch für *Brachyspira hyodysenteriae*, *Serpulina murdochii*, *Treponema denticola*, *Treponema pallidum* und die Euglenozoa und sind rot gekennzeichnet. Weitere gruppenspezifische Insertionen/Deletionen, die sich an Positionen 63A-63I, 188A, 189 und 264A, und 265-267 finden, sind hellgrün gekennzeichnet und näher im Text beschrieben. Fehlende Aminosäuren bedingt durch partielle Sequenzen oder Insertionen bzw. Deletionen sind als Striche dargestellt. Ein Doppelpunkt am Ende einer Sequenz bezeichnet ein Stopkodon. Die Konsensussequenz aller 28 Sequenzen ist unter Nummer 29 dargestellt. Prozentuale Identitäten auf dem Aminosäure-Niveau wurden paarweise zwischen den Sequenzen berechnet und sind in der Abbildung rechts unten aufgelistet.

mes Merkmal dieser Sequenzen besteht in spezifischen, gemeinsamen Insertionen von Aminosäuren, die sich an den Positionen 23A-23D (-LLGK-), 163A (-G-) und 301A-301D (-LP/KXE-, mit X=D,N,G) befinden (siehe Abb. 4, rot gekennzeichnet). Daneben besitzen die Proteine der Euglenozoa zusätzlich noch eine gemeinsame Insertion an den Positionen 63A-63E, 63G-63I (grün), die auch in *T. saccharophilum* vorhanden ist (hier 63A-63I). Die Insertionen an Positionen 23 und 301 enthalten geladene Aminosäuren, was darauf hindeutet, daß diese Bereiche sich an der Oberfläche der Proteine befinden. Auch in der GAPDH Gruppierung Gap-IV (auch in Abb. 4 vierte Gruppierung) findet sich eine spezifische Insertion an Position 188A und eine spezifische Deletion von drei Aminosäuren an den Positionen 265-267 (grün gekennzeichnet). Position 189 fehlt in *Borrelia burgdorferi*, den Parabasalia und auch der losen Gruppierung, der *Spirochaeta aurantia*, *Spirochaeta stenostrepta* und die Gram-Positiven angehören. Diese beiden Gruppierungen haben zumindest teilweise eine weitere gemeinsame Insertion an Position 264A.

3.1.4. Die Topologie des Gap-II Baums verändert sich in Abhängigkeit der Taxonstichprobe der Außengruppe

In einer weiteren phylogenetischen Analyse wurde die Position der *Euglena* GapA Sequenz im Gap-II Teilbaum genauer untersucht. Hierzu wurde eine kleinere Taxonstichprobe gewählt, die nur insgesamt 49 GAPDH Sequenzen enthielt (für eine genaue Auflistung siehe 2.11.). Der Anteil der eukaryotischen GAPDH Sequenzen wurde deutlich erhöht (21 GAPDH aus Eukaryoten), um eine genauere Einordnung der GapA Sequenz aus *Euglena* zu ermöglichen. Im Gap-II Teilbaum (Abb. 5) findet man, wie auch in Abb. 3 deutlich erkennbar, nur Gene von Cyanobakterien und photosynthetischen Eukaryoten. Auffällig ist die Position der GapA Sequenz aus *Euglena*, die mit Ausnahme der Gap2 Sequenz aus *Gloeobacter* tiefer als alle cyanobakteriellen Gap2 Sequenzen wurzelt. Eine mögliche Erklärung für diese ungewöhnliche Position könnte in einem Artefakt begründet sein (siehe auch Diskussion). In diesem Fall zieht die Außengruppe eine schnell evolvierende Sequenz (wie in diesem Beispiel die GapA aus *Euglena*) an die Basis der Innengruppe (Abb. 5A). Um zu testen, ob die Taxonstichprobe der Außengruppe die Position der *Euglena* Sequenz beeinflusst, wurden zwei wei-

tere phylogenetische Analysen durchgeführt. Diese beruhen auf einem Datensatz, der eine verringerte Anzahl von Taxa in der Außengruppe bzw. keine Außengruppe besitzt. Wie aus Abb. 5C ersichtlich, führt eine Reduktion der Außengruppe von 33 auf 27 Sequenzen dazu, daß sich die *Euglena* Sequenz aus dem cyanobakteriellen Feld an der Basis des Gap-II Teilbaums löst und sich nun zwischen Cyanobakterien und Rotalgen befindet. Eliminiert man die Außengruppe vollständig (Abb. 5D), so beobachtet man eine weitere Entfernung der *Euglena* Sequenz von der Basis des Gap-II Teilbaums, die damit zwischen den Sequenzen aus Rotalgen und Pflanzen (inklusive *Chlamydomonas*) zu liegen kommt. Interessanterweise scheint die Gap2 Sequenz aus *Gloeobacter* einem ähnlichen Phänomen zu unterliegen, da auch sie sich bei fehlender Außengruppe von der Basis entfernt und nun innerhalb der anderen cyanobakteriellen Gap2 Sequenzen mit *Anabaena* zusammenfällt.

Abb. 5. Einfluß der Taxonstichprobe der Außengruppe auf die Position von *Euglena*. A Schematische Darstellung des Phänomens: Weit entfernte Sequenzen in der Außengruppe ziehen die schnell evolvierende GapA Sequenz von *Euglena* an die Basis des Baums. B, C und D zeigen (Gap-II) NJ-Topologien, in denen schrittweise die Anzahl der Taxa in der Außengruppe verringert wurde. Die Zusammensetzung der Außengruppe in Abb. 5B (33 Sequenzen) ist in Material und Methoden (2.11.) aufgelistet. In C ist diese um 6 Taxa (*E. histolytica*, *G. lamblia*, *L. mexicana*, *H. influenzae*, *E. coli* und die cytosolische GapC Sequenz aus *T. brucei*) reduziert, und in D hat der Gap-II Teilbaum keine Außengruppe. Diese schrittweise Reduktion der Außengruppe führt dazu, daß sich *Euglena* von der Basis des Baums löst und in seine Mitte wandert. Die Abbildung enthält nur Bootstrap-Werte über 40%.

Abb. 5



3.2. Analyse der transkriptionellen Regulation von *gap* Genen in *Synechocystis*

3.2.1. Einfluß von Licht/Dunkel-Phasen und Inhibitoren des photosynthetischen Elektronenflusses auf die Transkriptionsrate der Gene *gap1* und *gap2*

Der Einfluß wechselnder Lichtbedingungen auf die Transkriptionsrate der beiden *gap* Gene in *Synechocystis* wurde mittels Northern Analysen untersucht. Hierzu wurden Kulturen bei Starklicht photoautotroph ($62,5 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$, bzw. 5000 Lux) bis in die exponentielle Phase angezogen ($\text{OD}_{580} \sim 0,3-0,5$) und nach einer 24-stündigen Dunkelphase wieder in gleiche Lichtverhältnisse transferiert. Aus Proben, die sukzessive 5 min bis 4 h belichtet worden waren, wurde RNA isoliert und einer Northern Analyse unterzogen.

Wie in Abb. 6A gezeigt, reduzierte eine 24-stündige Dunkelphase sowohl *gap1* als auch *gap2* Transkripte unter die Detektionsgrenze. Erneute Belichtung führte zu einer schnellen Akkumulation von *gap2* Transkripten, die nach ca. einer Stunde ihr Maximum erreichte. Im Gegensatz dazu akkumulierten *gap1* Transkripte langsam und waren erst nach vier Stunden Belichtung detektierbar.

Zugabe von Glukose im Dunkeln induzierte ebenfalls die Transkription der beiden *gap* Gene, allerdings akkumulierten unter diesen Bedingungen Transkripte beider Gene langsam und die Menge an *gap2* Transkripten war wesentlich geringer als unter Lichtbedingungen (Abb. 6B).

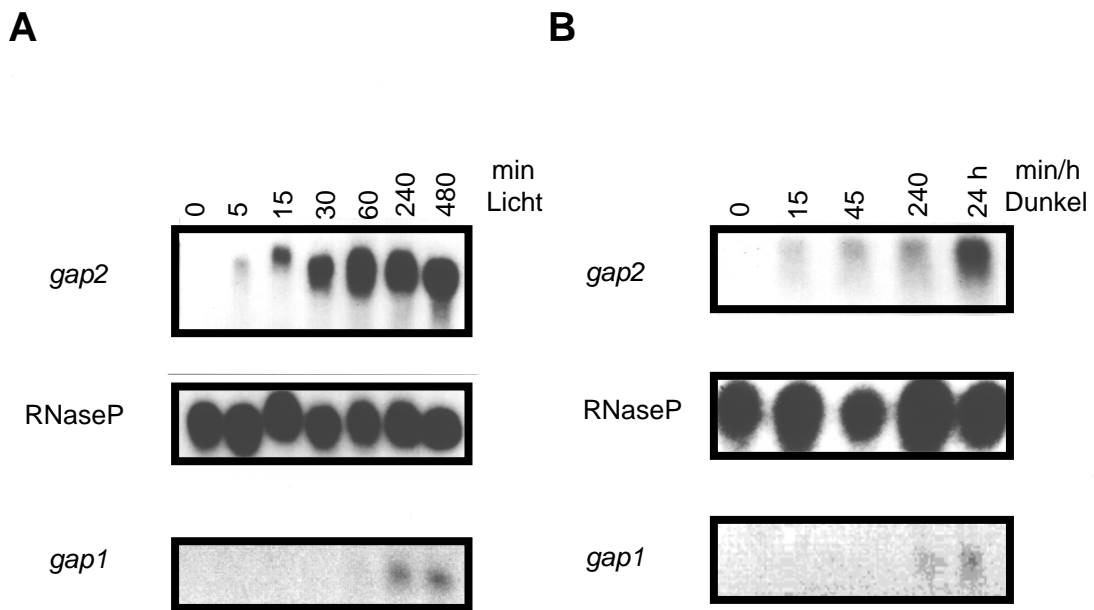


Abb. 6. Induktion von *gap1* und *gap2* Transkription durch Licht (A) und Glukose im Dunkeln (B).

Wildtyp *Synechocystis* wurde unter Starklicht (HL) bis in die mittlere logarithmische Phase angezogen und daraufhin 24 Stunden verdunkelt. Kulturen wurden nun entweder wieder belichtet oder nach Zugabe von Glukose weiter im Dunkeln inkubiert. Die erste Probe wurde vor Wiederbelichtung oder Zugabe von Glukose genommen. Weitere Proben wurden nach den angegebenen Zeiten in Minuten (ansonsten spezifiziert) nach Veränderung der Wachstumsbedingungen genommen. Extrahierte RNA wurde einer Northern Analyse unterzogen (siehe Material und Methoden). Filter wurden nacheinander jeweils mit *gap1*-, *gap2*- und RNaseP-spezifischen Sonden hybridisiert.

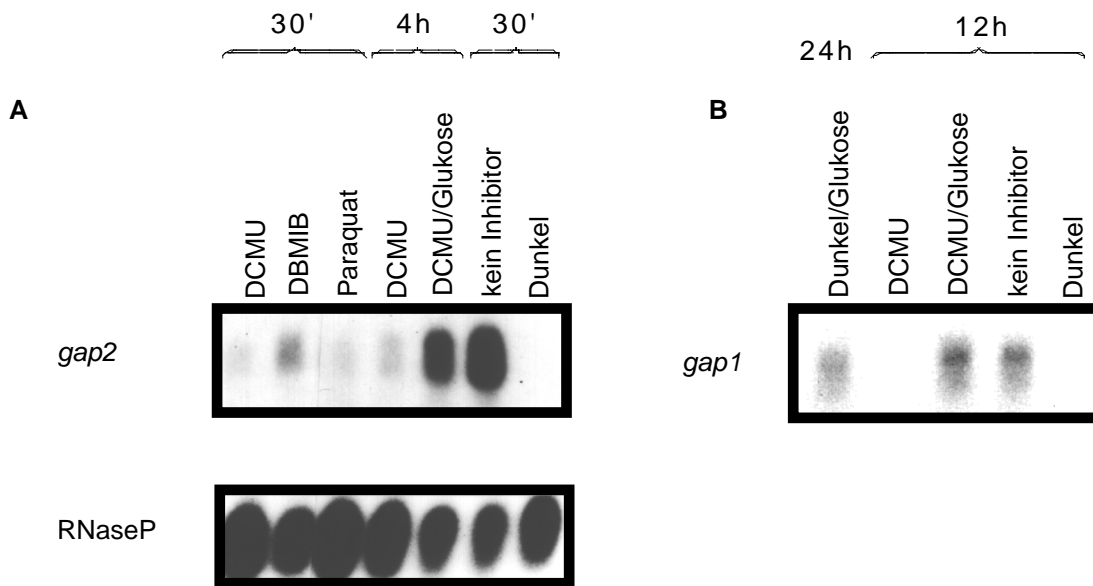


Abb. 7. Einfluß von Elektronen Transport Inhibitoren auf *gap2* (A) und *gap1* (B) Transkription.

Synechocystis Kulturen wurden wie in Abb. 6 angezogen, 24 h verdunkelt und 15 min vor der Wiederbelichtung mit Inhibitoren des photosynthetischen Elektronenflusses behandelt. Glukose wurde zum Zeitpunkt der Wiederbelichtung zugesetzt. Dunkelproben wurden vor der Zugabe der Inhibitoren und Glukose genommen.

In **Abb. 7A** wurden weitere Proben nach 30 min HL ohne Inibitor, mit 10^{-5} M DCMU, 10^{-5} M DBMIB und $3 \cdot 10^{-4}$ M Paraquat genommen. Proben wurden ebenfalls nach 4 h HL mit 10^{-5} M DCMU und 10^{-5} M DCMU und zusätzlich 50 mM Glukose genommen.

In **Abb. 7B** wurden Proben nach 12 h HL ohne weitere Behandlung (kein Inhibitor) nach Zugabe von DCMU *ad* 10^{-5} M (DCMU) und DCMU *ad* 10^{-5} M, Glukose *ad* 50 mM (DCMU/Glukose) genommen. Für Spur 1 wurde *gap1* Transkription 24 Stunden im Dunkeln durch 50 mM Glukose (Dunkel/Glukose) induziert.

In einer weiteren Studie wurde der Einfluß von Inhibitoren des photosynthetischen Elektronenflusses auf die beiden *gap* Gene untersucht. Kulturen wurden wiederum einer 24-stündigen Dunkelphase unterworfen, aber 15 min vor erneuter Belichtung mit den Inhibitoren DCMU, DBMIB und Paraquat versetzt. Wie in Abb. 7 deutlich zu sehen ist, verringerten alle drei Inhibitoren während einer Belichtungsdauer von 30 min die Menge an *gap2* Transkripten

(Abb. 7A). Der inhibitorische Effekt von DCMU konnte zumindest teilweise durch die Zugabe von Glukose kompensiert werden. Für die Untersuchung der *gap1* Transkription wurde ein Induktionszeitraum von 12 Stunden ausgewählt, was Untersuchungen mit den Inhibitoren DBMIB und Paraquat ausschloß, da DBMIB lichtempfindlich ist und eine ausgedehnte Behandlung mit Paraquat zu oxidativem Streß und nachfolgendem Zelltod führt (Mohamed und Jansson, 1991). Abb. 7B zeigt, daß ebenso wie im Fall von *gap2*, die Transkription des *gap1* Gens durch DCMU inhibiert wurde und daß Glukose die Transkription von *gap1* im Dunkeln oder im Licht in Präsenz von DCMU induzierte.

Um festzustellen, ob die Hemmung der Translationsmaschinerie die Menge an *gap2* Transkripten beeinflußt, wurden Kulturen nach einer 24-stündigen Dunkelphase vor erneuter Belichtung mit dem Translationsinhibitor Erythromycin (0.1 mg/ml) behandelt. Diese Behandlung führte zu einem geringfügigen Rückgang an *gap2* Transkripten (Abb. 8).



Abb. 8. Einfluß von Erythromycin und DCMU auf die *gap2* Transkription. *Synechocystis* wurde wie in Abb. 6 angezogen. Nach einer 24 h Dunkelphase wurde kein Inhibitor, DCMU *ad* 10^{-5} M und Erythromycin (Ery) *ad* 100 µg/ml zugegeben und daraufhin wurden die Zellen wieder in HL transferiert.

3.2.2. Bestimmung des Transkriptionsstartpunkts des *gap2* Gens

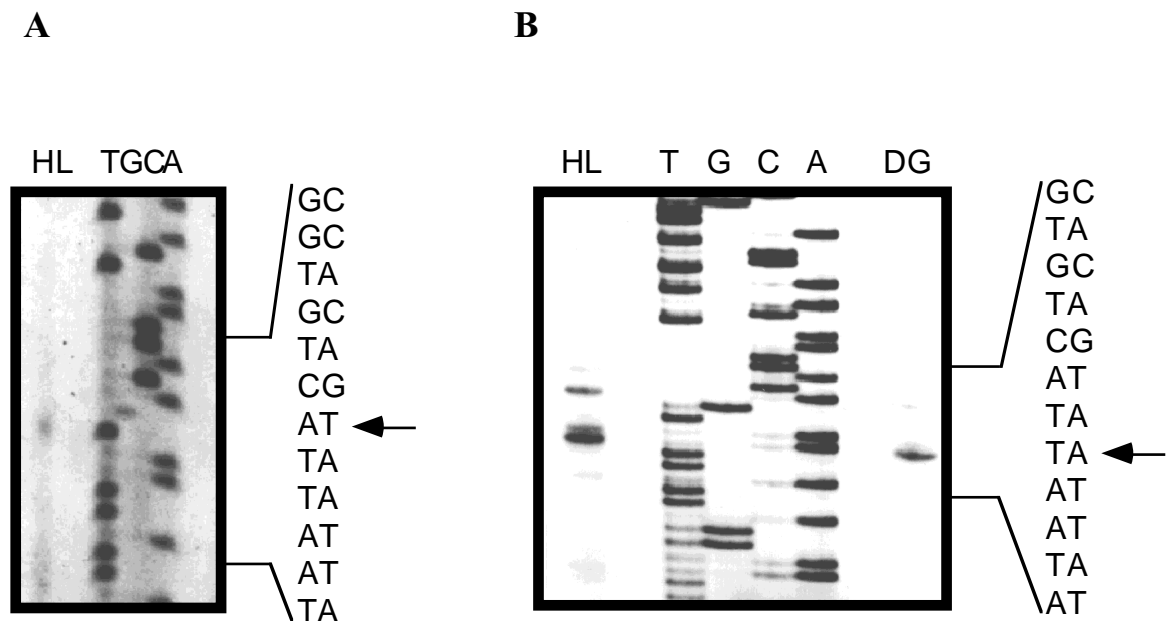


Abb. 9. Bestimmung des Transkriptionsstartpunkts des *gap2* Gens mittels Primer-Verlängerung (A) und Nuklease-Verdau (B).

A Im Sequenzgel aufgetrenntes Produkt der Primer-Verlängerung (RNA aus autotropher Kultur, HL) zusammen mit den entsprechenden Sequenzreaktionen. Versuchsbedingungen sind in Material und Methoden beschrieben. Die Spuren der DNA-Sequenz-Reaktionen, die mit dem gleichen Primer wie die Primer-Verlängerung durchgeführt wurde, sind in der Reihenfolge TGCA aufgetragen. Als Startpunkt konnte ein A identifiziert werden, das durch einen Pfeil gekennzeichnet ist.

B RNA aus autotrophen (HL) und heterotrophen (DG) *Synechocystis*-Kulturen wurde mit einem radioaktiv markierten DNA-Einzelstrang definierter Länge hybridisiert. Heteroduplex-DNA wurde mit Mung Bohnen Nuklease verdaut und die Produkte zusammen mit Sequenzreaktionen aufgetrennt. Das in den Sequenzreaktionen eingesetzte Oligonukleotid besaß das gleiche 5'-Ende wie der radioaktive Einzelstrang. Verwendung von HL- und DG-induzierten Kulturen ergab ein ähnliches Bandenmuster, wobei das hauptsächliche Produkt des Verdaus ein Thymin-Nukleotid darstellt.

Der Transkriptionsstartpunkt des *gap2* Gens wurde sowohl unter autotrophen als auch photoheterotrophen Bedingungen mittels zweier sich ergänzender Techniken, der Primer-Verlängerung (primer extension) und Mung Bohne Nuklease (nuclease protection assay) Analyse bestimmt. Bei der Primer-Verlängerung (heterotrophe Bedingungen nicht gezeigt) ergab sich eine einzelne Bande, die bei gleichzeitiger Auftrennung von Sequenzreaktionen desselben Primers auf gleicher Höhe wie ein Adenin-Nukleotid, 50 Basenpaare vom Beginn der kodierenden Sequenz lief (Abb. 9A). Die Nuklease-Analyse ergab mehrere mögliche Startpunkte, wobei die stärkste Bande ein Thymin-Nukleotid auswies, das zwei Basen von dem in der Primer-Verlängerung identifizierten Adenin entfernt ist (Abb. 9B). Das Auftreten von mehreren Banden ist vermutlich durch nicht vollständigen Abbau der DNA Sequenz direkt am Ende des Heteroduplex zu erklären.

3.2.3. Die Expression des *gap2* Gens wird durch *cis*-Elemente reguliert, die sich im 5'- und 3'-Bereich des Minimalpromotors befinden.

Um *cis*-Elemente des *gap2* Promotors zu identifizieren, wurden transkriptionelle *gap2-cat* Fusionen in dem konjugierbaren Vektor pSB2A, dessen Kopienzahl in *Synechocystis* der Anzahl der Chromosomen entspricht (Marraccini et al., 1993), konstruiert. Reportergenaktivitäten (Chloramphenicolacetyltransferase, CAT) waren generell in photoautotrophen *Synechocystis*-Kulturen höher (1,4 bis 2,6 Mal) als in photoheterotroph angezogenen (Abb. 10). Dieses Ergebnis deckt sich damit mit den Daten der Northern Analysen, die zeigen, daß *gap2* ebenfalls unter photoautotrophen Bedingungen stärker transkribiert wird (Abb. 7A). In Abb. 10 ist schematisch die *in vivo* Deletionsanalyse des *gap2* Promotors dargestellt, die mit einem 610 bp Fragment (pT1) begonnen wurde. pT1 besitzt 443 bp stromaufwärts und 167 bp stromabwärts vom Transkriptionsstartpunkt und beinhaltet damit einen Teil der *Gap2*

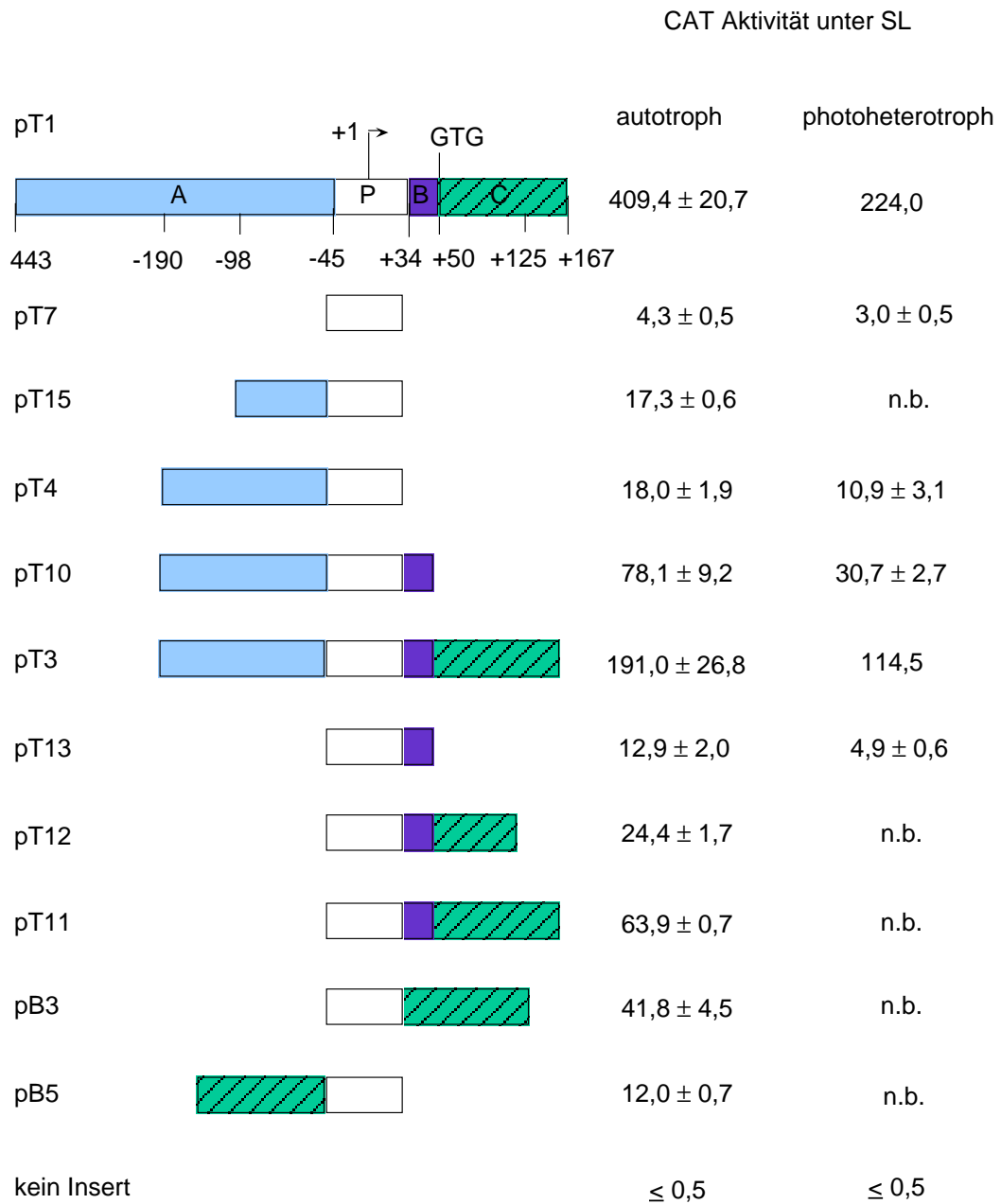


Abb. 10. *gap2-cat* transkriptionelle Fusionen und zugehörige CAT-Aktivitäten. Analyse von *gap2* Promotor-Regionen, die in den Reportervektor pSB2A kloniert wurden. *Synechocystis*-Stämme mit rekombinanten Plasmiden, als pT1 bis pT15 und pB1 bis pB5 bezeichnet, wurden wie in 2.10.5. beschrieben angezogen und ihre CAT-Aktivitäten bestimmt. Die Nummerierung unter den Konstrukten bezieht sich auf Nukleotid-Positionen im *gap2* Promotor, wobei +1 (Pfeil) und +50 (GTG) entsprechend den Start der Transkription (Primer-Verlängerung) und Translation (GTG Kodon) angeben. Der Minimalpromotor (P) ist weiß dargestellt; andere Farben entsprechen: hellblau: Element A; violett: Element B; türkis, gestreift: Element C. n.b.: nicht bestimmt.

kodierenden Region (117 bp). Deletionsreihen im 5'- und 3'-Bereich relativ zum Transkriptionsstart zeigten, daß beide Regionen für die maximale Transkriptionsrate des *gap2* Gens benötigt werden. Gleichzeitig wurde auch der Minimalpromotor (P, Konstrukt pT7) identifiziert, der sowohl unter autotrophen als auch heterotrophen Bedingungen aktiv ist.

Schrittweise Deletionen am 5'-Ende des *gap2* Gens führten zu immer kleiner werdenden CAT-Aktivitäten, was darauf hindeutet, daß die Region von -443 bis -45 mindestens ein positives *cis*-Element beinhaltet. Eine genauere Untersuchung dieser Region zeigte, daß sie vermutlich drei Teilelemente besitzt. Die beiden DNA-Bereiche von -443 bis -190 und -98 bis -45 stimulieren beide die *gap2* Promotor-Aktivität (vergleiche pT1 und pT3; pT15 und pT7). Dagegen besitzt der zwischen diesen beiden Elementen liegende Bereich (-190 bis -98) keinen Einfluß auf die Aktivität von P (vergleiche pT4 mit pT15).

Ebenso zeigte sich, daß Deletionen im Bereich stromabwärts von P die zugehörigen CAT-Aktivitäten immer weiter reduzierten, was am deutlichsten bei einem Vergleich der Konstrukte pT11 (-45 bis +167, komplette Region stromabwärts von P) und pT7 (Bereich stromabwärts von P völlig deletiert) zu sehen ist, da die zugehörigen CAT-Aktivitäten um einen Faktor von 15 differieren. Dieser Faktor setzt sich aus der Erhöhung der Promotorstärke zusammen, die durch die nicht translatierte Region des *gap2* Gens (3-4 fach, +34 bis +50, Element B, vergleiche pT4 mit pT10 und pT13 mit pT7) und seiner kodierenden Region (2,5 bis 5 fach, +50 bis +167, Element C, vergleiche pT3 mit pT10 und pT11 mit pT13) hervorgerufen wird. Daß es im Fall einer Deletion von B in Anwesenheit von C zu einem Abfall der Aktivität kommt (vergleiche pT11 und pB3), zeigt, daß B tatsächlich die Aktivität des *gap2* Promotors steigert. Interessanterweise scheint Element C die Aktivität des *gap2* Promotors unabhängig von seiner Position zu steigern (vergleiche pB3 und pB5 mit pT7) und besitzt damit eine typische Eigenschaft transkriptioneller „Enhancer-Elemente“ (Kustu et al., 1991). Daß Element C in seiner natürlichen Position stromabwärts von P eine größere Steigerung der *gap2* Promotoraktivität erzeugt, deutet darauf hin, daß C auch die Stabilität der *gap2* mRNA erhöhen könnte.

In einer weiteren Studie wurde getestet, ob die Behandlung mit DCMU oder Erythromycin die CAT-Aktivitäten des längsten (pT1) und des kürzesten (pT7) Promotorkonstrukts in unterschiedlicher Weise beeinflussen. Abb. 11 zeigt, daß in beiden Fällen die Transkription des *cat* Gens durch DCMU inhibiert und durch Erythromycin stabilisiert wird.

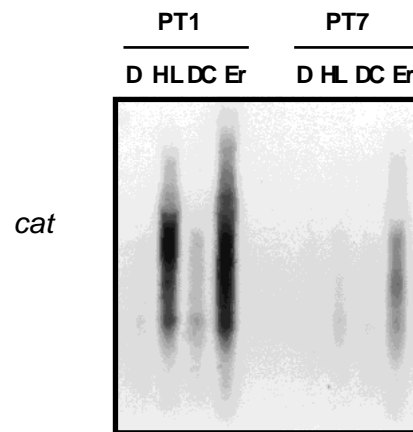


Abb.11. Einfluß von Erythromycin und DCMU auf die durch den *gap2* Promotor gesteuerte *cat* Transkription. *Synechocystis*-Stämme mit den *gap2* Promotorkonstrukten pT1 und pT7 wurden wie in Abb. 6 angezogen. Nach einer 24 h Dunkelphase wurde kein Inhibitor (HL), DCMU ad 10^{-5} M (DC) und Erythromycin (Ery) ad 100 mM zugegeben und daraufhin wurden die Zellen wieder in HL transferiert. Northern Filter wurden mit einer *cat*-spezifischen Sonde hybridisiert.

3.2.4. Charakterisierung eines *Enhancer*-Elements im nicht translatierten 5'-Bereich des *gap2* Gens

Element B wurde nachfolgend genauer charakterisiert. Position und Orientierung von B in Relation zu P wurden verändert, und die zugehörigen CAT-Aktivitäten ermittelt. Aus Abb. 12 wird ersichtlich, daß Element B unabhängig von seiner Orientierung und Position die Stärke des *gap2* Promotors erhöht (Vergleiche hierzu pT13 mit pEH1 und pT7; pEH2 und pEH3 jeweils mit pT7). Selbst 145 bp stromaufwärts von P steigert B die CAT-Produktion um einen Faktor von 2 bis 3 (pEH4, pEH5 gegenüber pT4). Intrinsische Promotoraktivität in

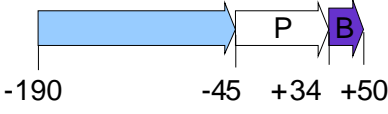

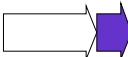
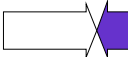
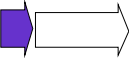






CAT Aktivität unter SL			
		autotroph	photoheterotroph
pT10		78,1 ± 9,2	30,7 ± 2,7
pT7		4,3 ± 0,5	3,0 ± 0,5
pT13		12,9 ± 2,0	4,9 ± 0,6
pEH1		9,5 ± 0,4	5,8 ± 1,2
pEH2		21,9 ± 0,9	13,5 ± 1,8
pEH3		44,9 ± 4,6	21,0 ± 2,2
pEH4		34,9 ± 3,1	17,8 ± 1,8
pEH5		52,1 ± 5,5	26,6 ± 4,2
pT4		18,0 ± 1,9	10,9 ± 3,1
pEH6		0,9 ± 0,2	0,4 ± 0,3
pEH7		0,6 ± 0,4	0,2 ± 0,1
kein Insert		≤ 0,5	≤ 0,5

Abb. 12. Element B im nicht translatierten 5'-Bereich wirkt als transkriptioneller Enhancer. Kulturbedingungen und Bestimmung der CAT-Aktivität wurden in Material und Methoden beschrieben. Element B wurde in positiver und negativer Orientierung stromaufwärts und stromabwärts von P und 145 bp stromaufwärts von P kloniert. Die Farben der *cis*-Elemente entsprechen Abb. 10; ihre Orientierung in Relation zum *cat* Reportergen ist durch Pfeile dargestellt (Pfeilspitze nach rechts im Fall von positiver Orientierung).

Element B kann als Ursache für seine aktivierende Wirkung ausgeschlossen werden, da B allein zu keiner Transkription des *cat* Gens führt (pEH6, pEH7).

Die Suche nach der Präsenz von weiteren Elementen B im *Synechocystis* Genom ergab drei Bereiche, in denen zumindest 11 zusammenhängende Basen von Element B (16 Basen) konserviert sind. Die Bereiche liegen allerdings alle innerhalb von offenen Leserastern, die eine lösliche lytische Transglykosylase (slr0534), ein hypothetisches Protein (slr0366) und ein vermutlich an Rekombinationsvorgängen beteiligtes Protein, RecR (slr1426), kodieren.

Um ein Motiv in Element B zu charakterisieren, an das möglicherweise ein Transfaktor bindet, wurde B basierend auf pT10 einer Mutationsanalyse unterzogen (Abb. 13A). Bei Transversion aller 16 Basenpaare von B ergab sich ein kompletter Verlust der Aktivierung durch B (Vergleiche Konstrukt pTRT mit pT4 und pT10). Die gleichzeitige Transversion von zwei Adenin-Nukleotiden an den Positionen 14 und 15 (Konstrukt pTR9) führte zu einer Verringerung der CAT-Aktivität um einen Faktor von zwei. Da Transversionen von jeweils einem dieser Adenin-Nukleotide nur in wesentlich geringerem Maß die Aktivität von B reduzierten (pTR1, pTR2), muß man von einem synergistischen Effekt dieser beiden Adenin-Nukleotide auf die Funktion von B ausgehen. Basierend auf diesen und den sie umgebenden Nukleotiden wurde im *gap2* Promotor und auch in anderen Promotoren nach entsprechenden Elementen gesucht. Interessanterweise gehören die beiden Adenin-Nukleotide offensichtlich zu dem relativ gut konservierten Motiv 5'-agaTYAACG-3', das von vielen ebenfalls konservierten Purin-Nukleotiden eingerahmt wird. Dieses Motiv ist in den zwei weiteren positiven *cis*-Elementen des *gap2* Promotors (A, stromaufwärts von P; C, in der kodierenden Region von *gap2*) konserviert. Daneben findet sich es sich ebenfalls im *gap1* Promotor von *Synechocystis*, in einem stromaufwärts vom basalen Promotor gelegenen positiven *cis*-Element des *secA* Gens ebenfalls in *Synechocystis* (Mazouni et al., 1998) und im Enhancer Element des *psbA2* Gens in *Synechococcus* (Li et al., 1995). Somit spielt dieses Motiv möglicherweise in der transkriptionellen Regulation von so verschiedenen Prozessen wie Calvin-Zyklus und Glykolyse (*gap* Gene), Protein-Sekretion (*secA*) und photosynthetischem Elektronenfluß (*psbA2*) eine Rolle.

A

Plasmid	Sequenz von Element B	CAT- Aktivität
pT10 (WT)	AGAGGGCAAGACGAAC	78,1 ± 9,2
pTRT	CTCTTTACCTCATCCA	22,7 ± 3,5
pT4	kein Element B	18,0 ± 1,9
pTR1CA	59,8 ± 2,6
pTR2TC..	60,1 ± 0,5
pTR3AG....	78,4 ± 2,1
pTR4CT.....	68,5 ± 1,3
pTR5AC.....	66,0 ± 2,0
pTR6TT.....	56,6 ± 2,0
pTR7	..CT.....	60,4 ± 0,3
pTR8	CT.....	50,0 ± 5,0
pTR9TCC.	38,8 ± 1,2
pTR10TCA....	71,5 ± 0,0
pTR11ACC.....	56,8 ± 0,1
pTR12	...TTT.....	51,9 ± 1,6

B

Nukleotid-Sequenz	Gen Ursprung	Position	Rolle	Ref.
AGAGGGCAAGACGAACgtgactagagtagc	gap2 S.6803	+35, +64a	(EltB)	1
AGAGGCCACGGTAACAGCGACGGAGAGAA	gap2 S.6803	-103, -74a	(EltA)	1
TAGAGTAGCAATTAACGGATTGGAACGGAT	gap2 S.6803	+56, +85a	(EltC)	1
AGTAGTCGGTATCAACGACACCTCTGATCC	gap2 S.6803	+137, +166a	(EltC)	1
AAGGAGCTGGGTTAACGTTAGGGCAAGTCG	gap1 S.6803	-39, -10b		2
GGTCAAAGATATCAACTTATAGGCATATAT	gap2 A.29143	-47, -18b		3
GTATTTACACCTGAACGCACGTACGAGGGT	gap2 S.7942	-38, -9b		4
GGATTTGCAGATCAACCACTAGTCACTGAC	secA S.6803	-84, -55a	(Elt PE1)	5
TCGTAAATAGTTCAACTAAGGACTCATCGC	psbA2 S.7942	+17, +46a	(Enhancer)	6

rgnrnrmrAgATyAACgnnnrnrcarrnry Konsensus

Abb. 13. Mutationsanalyse von B und Alignment der konservierten Enhancer-Region

A Mutationsanalyse von Element B im Kontext von pT10 (-190; +50, siehe auch Abb. 10). Die nicht transkribierte Sequenz von Wildtyp Element B ist mit mutierten Elementen B in einem Alignment dargestellt. Substituierte Nukleotide (Transversionen) sind in blau, konservierte Nukleotide als Punkte dargestellt. CAT-Aktivitäten wurden unter SL-Bedingungen ermittelt.

B Sequenz-Alignment von Promotor-Regionen verschiedener Gene aus unterschiedlichen Cyanobakterien; entsprechend: *Anabaena variabilis* ATCC 29143 (A.29143), *Synechococcus* PCC7942 (S.7942) und *Synechocystis* PCC6803 (S.6803). Stark konservierte Nukleotide sind blau gekennzeichnet. Die Sequenz stromabwärts von Element B ist in Kleinbuchstaben geschrieben. Die Konsensussequenz ist in der untersten Zeile dargestellt. Die Zahlen hinter den Genbezeichnungen beziehen sich auf ihre Distanz hinsichtlich des Transkriptions- (a) oder Translationsstarts (b). Die Funktion der entsprechenden DNA-Regionen ist, sofern bekannt, in Klammern angegeben. Refe-

renzen sind wie folgt: 1, diese Arbeit; 2, (Koksharova et al., 1998); 3, (Martin et al., 1993); 4, (Figge et al., 1999); 5, (Mazouni et al., 1998); 6, (Li und Golden, 1993; Li et al., 1995). Elt: Element.

3.2.5. Partielle Aufreinigung eines Element B-spezifischen Transfaktors mittels Heparin-Sepharose Affinitätschromatographie

Da die transkriptionsaktivierende Wirkung des Enhancer-Elements B vermutlich auf der Bindung eines Transfaktors beruht, wurden *Synechocystis* Protein-Rohextrakte mittels Gelretardationsexperimenten auf Element B spezifische DNA-Bindeaktivität getestet. Das in den Gelretardationsexperimenten eingesetzte *gap2* Promotorfragment GS1 umfaßte dabei Element B im Zentrum (16 bp), 19 bp stromaufwärts und 18 bp stromabwärts von Element B (Abb. 14). Da im Rohextrakt keine spezifische Bindung gezeigt werden konnte, wurden aus diesem DNA-bindende Proteine mittels Heparin-Sepharose Affinitätschromatographie angereichert und wiederum in Gelretardationsexperimenten getestet. Abb. 14 zeigt das Ergebnis eines solchen Experiments, allerdings ist nur ein Teil des Elutionsprofils, nämlich Fraktion 4 - 11, entsprechend der ungefähren NaCl-Konzentration von 0,05 bis 0,4 M, abgebildet. Deutlich ist in den Fraktionen der Konzentration 0,15 bis 0,3 M eine Retardation des markierten DNA-Fragments zu sehen. Weitere Mobilitätsveränderungen wurden insbesondere in Fraktionen mit hoher NaCl-Konzentration beobachtet, erwiesen sich aber alle als unspezifische Bindungen (nicht gezeigt). Um zu testen, ob die in Abb. 14 beobachtete Retardation auf einer spezifischen Protein-DNA-Wechselwirkung beruht, wurden Gelretardationsexperimente unter Verwendung des spezifischen Kompetitors (GS1 selbst) und eines unspezifischen Kompetitors, eines 150 bp langen DNA Fragments des GapC4 Promotors aus Mais (Köhler et al., 1995), durchgeführt. Wie aus Abb. 15A ersichtlich, führt schon ein zehnfacher Überschuß an unmarkiertem spezifischem Kompetitor zu einer starken Reduktion an gebundenem radioaktiv markiertem Fragment GS1. Eine weitere Steigerung des Überschusses an unmarkiertem Fragment GS1 zeigt, daß dieses eindeutig mit markiertem GS1 um die Bindung eines Proteinfaktors konkurriert. Dagegen kommt es bei Zugabe von unspezifischem Kompetitor (Abb. 15B) selbst bei 200-fach molarem Überschuß zu keiner deutlich erkennbaren Reduktion der GS1-Protein-Interaktion. Aufgrund dieser spezifischen DNA-Protein-Interaktion wurden zur genaueren Bestimmung der Proteinbindungsstelle in GS1 Derivate von GS1 als Kompetito-

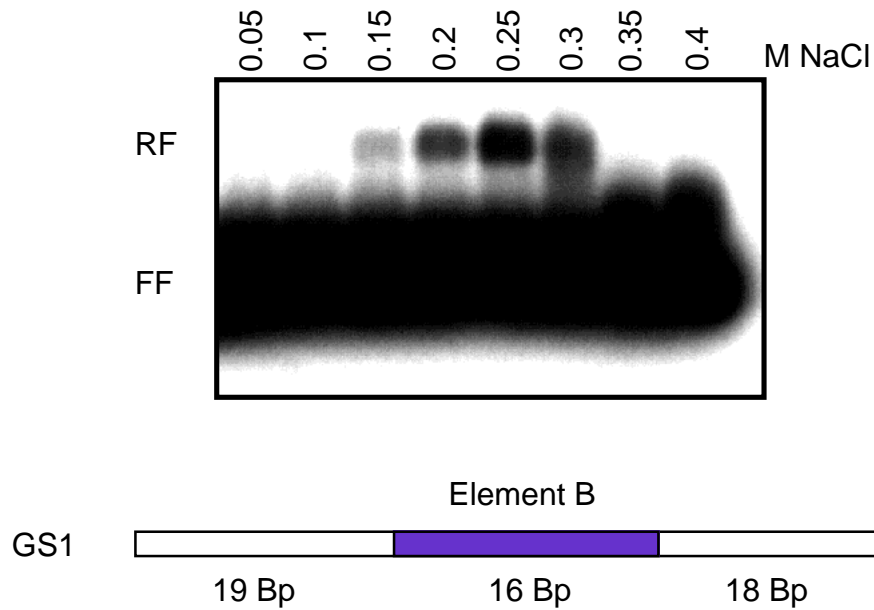


Abb. 14. DNA-Gelretardation des *gap2* Promoter Fragments GS1 mit an DNA-Bindeproteinen angereicherten Zellysaten. Aus Lysaten löslicher Proteine von unter SL angezogenen *Synechocystis*-Kulturen wurden DNA-Bindeproteine mittels Heparin-Sepharose Chromatographie angereichert. Proteine wurden mit einem aufsteigenden linearen NaCl-Gradienten (0-1 M) eluiert und mit dem *gap2* Promotor-Fragment GS1 auf Bindeaktivität getestet. Abkürzungen RF: Retardiertes Fragment; FF: Freies Fragment.

ren eingesetzt. Diese tragen Transversionen in allen 19 Basenpaaren stromaufwärts von Element B (Abb. 16B, GS1/1), in Element B selbst (GS1/2) und in allen 18 bp stromabwärts von Element B (GS1/3). Abb. 16A zeigt ein Gelretardationsexperiment, bei welchem die DNA-Fragmente GS1/1-3 als Kompetitoren in 200-fachem Überschuß eingesetzt wurden.

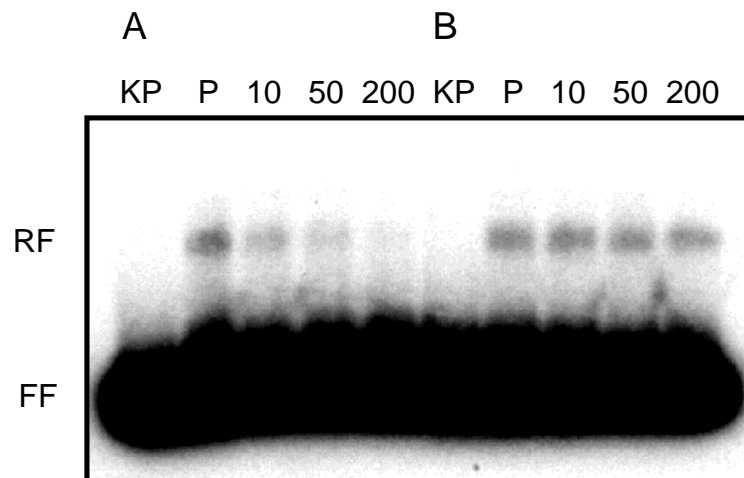
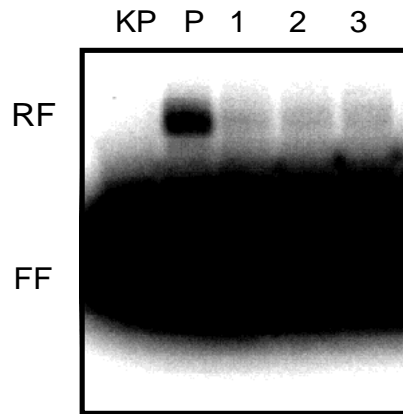


Abb. 15. DNA-Gelretardation des *gap2* Promotorfragments GS1 und Wettbewerbsstudien mit spezifischem (A) (GS1 selbst) und unspezifischem Wettbewerber (B) (150 bp Fragment des GapC4 Promotors aus Mais). Wettbewerber wurden in 10-, 50- und 200-fachem Überschuß zugegeben. KP Kein Protein; P Protein; RF Retardiertes Fragment; FF Freies Fragment.

Alle drei mutierten Fragmente konkurrieren mit GS1 um die Proteinbindung, was ebenso bei einem geringeren Überschuß (50 x) beobachtet wurde (nicht gezeigt). Die Ergebnisse dieser *in vitro* Wettbewerbsstudien stehen damit in Widerspruch zu den *in vivo* Promotoranalysen, in denen die vollständige Transversion von Element B zu einem Verlust der Aktivierung führt (Abb. 13A). Allerdings weichen Proteine *in vitro* sehr häufig von ihrem Verhalten *in vivo* ab (Ausubel et al., 1987), so daß es möglich ist, daß dieser hier charakterisierte Transfaktor trotz dieser Diskrepanz für die transkriptionsteigernde Wirkung von Element B verantwortlich ist.

A



B

GS1	5´-ATGTACTGAGCTAAAACAGAGAGGGCAAGACGAACGTGACTAGAGTAGCAATT-3´
GS1/1	5´-CGTGCAGTCTAGCCCCACTAGAGGGCAAGACGAACGTGACTAGAGTAGCAATT-3´
GS1/2	5´-ATGTACTGAGCTAAAACAGCTCTTTACCTCATCCAAGTACTAGAGTAGCAATT-3´
GS1/3	5´-ATGTACTGAGCTAAAACAGAGAGGGCAAGACGAACGTCAGCTCTGCTACCGG-3´

Abb. 16. DNA Gelretardation des *gap2* Promotor-Fragments GS1 und Kompetitionsstudie mit drei mutierten GS1 (GS1/1-3,) Fragmenten (A), Nukleotidsequenzen der Kompetitor-Fragmente (B). Letztere lagen jeweils in 200-fach molarem Überschuß vor. Durch Transversionen ersetzte Bereiche sind blau dargestellt. 1: GS1/1; 2: GS1/2; 3: GS1/3; RF retardiertes Fragment; FF freies Fragment.

3.2.6. Mutagenese und Analyse der -35 und -10 Region des *gap2* Minimalpromotors

Der *gap2* Minimalpromotor besitzt eine gut konservierte -10 Region sieben Basenpaare stromaufwärts vom Startpunkt der Transkription, also in einer Distanz, die typisch für die meisten *E. coli* Promotoren ist (Harley und Reynolds, 1987). Mutationen von zwei nebeneinander liegenden Basenpaaren in dieser Region verringerten die CAT-Aktivitäten drastisch um Faktoren von 7 bis 117 (Abb. 17, Konstrukte pC5, pC6, pC7) und zeigen damit, daß es sich hierbei tatsächlich um die funktionelle -10 Region des *gap2* Promotors handelt. In einer Distanz von 17 ± 1 bp von der -10 Region, in der sich in *E. coli* und *B. subtilis* bevorzugt die -35 Box befindet, fehlt eine konservierte -35 Region im *gap2* Promoter. Allerdings besitzt er 29 bp stromaufwärts von der -10 Region die Sequenz 5'-TTGAaA-3', in der nur eine Base (a statt C) nicht mit der Konsensussequenz von *E. coli* übereinstimmt. Die vollständige Mutation dieser sechs Basenpaare (pC1) verringerte die CAT Produktion nicht und zeigt damit, daß dieses Motiv für die Transkription des *gap2* Promotors unter Standard Wachstumsbedingungen keine Rolle spielt (autotroph, 3000 Lux). Deletiert man aber 12 bp zwischen den beiden Boxen, was 5'-TTGAaA-3' in die Distanz von 17 bp von der -10 Region bringt, so steigert dieses Motiv die Promotor-Aktivität um mehr als den Faktor drei (pC2). Diese Steigerung könnte auf der Deletion eines Repressor-Binde-Motivs (i) oder der Annäherung eines stromaufwärts gelegenen positiven *cis*-Elements an die RNA-Polymerase-Bindestelle (ii) beruhen. Möglichkeit (i) kann ausgeschlossen werden, da die Mutagenese der in pC2 deletierten Region zu keiner Abnahme der Promotoraktivität führt (pC3 gegenüber WT). Die Mutagenese der mutmaßlichen -35 Region, die sich 17 bp von der -10 Region entfernt befand, senkte die CAT-Aktivität auf den dem Wildtyp-Promotor entsprechende Werte (pC22). Dies macht deutlich, daß die beobachtete Steigerung der CAT-Produktion in pC2 tatsächlich auf der Annäherung der -35 Box an die -10 Region beruht und (ii) nicht etwa auf der Positionsveränderung eines anderen *cis*-Elements.

3.2.7. Eine -16 Region in einem cyanobakteriellen Promotor

Die funktionelle Bedeutung der Sequenz 5'-TAGGA-3', die sich stromaufwärts der -10 Region befindet, wurde ebenfalls untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß sie eine ebenso wichtige Rolle für die *gap2* Promotoraktivität spielt wie die beiden zentralen Nukleotide der -10 Region (pC7). Transversionen von 5'-TA-3' zu 5'-GC-3' führten zu einer achtfachen Verringerung der Promotoraktivität (Abb. 17, vergleiche pC4 mit WT). Ebenso führte ein Ersetzen von 5'-GG-3' durch 5'-CC-3' zu einer Verringerung der CAT Produktion um den Faktor sieben (pC42 gegenüber WT) und die Transversion von 5'-AA-3', stromaufwärts von 5'-TAGGA-3', zu 5'-CC-3' zu einer Verringerung um den Faktor drei (pC41 gegenüber WT). Zusammenfassend zeigen diese Beobachtungen, daß das 5'-TAGG-3' Motiv des *gap2* Promotors in Sequenz (5'-TRTG-3'), Position und Funktion den -16 Elementen aus grampositiven Bakterien sehr ähnlich ist (Voskuil und Chambliss, 1998). Somit handelt es sich bei dem Motiv 5'-TAGG-3' offensichtlich ebenfalls um ein -16 Element, das damit das erste beschriebene Promotorelement dieser Art in Cyanobakterien darstellt. Basierend auf dieser Beobachtung wurden Promotoren von Cyanobakterien und anderen Organismen auf die Präsenz entsprechender Sequenzmotive untersucht. Abb. 17B zeigt, daß offensichtlich auch Promotoren von Cyanophagen und Plastiden aus Grünalgen (*Chlamydomonas*) und Pflanzen (Weizen) eine -16 Region besitzen.

Es wurde ebenfalls untersucht, ob das Motiv 5'-TAGGAT-3', das stromaufwärts der -10 Region liegt, selbst als -10 Region funktionieren könnte. Befindet sich das -35 Motiv 5'-TTGAaA-3' in der richtigen Distanz von 17 bp von obigem Motiv (pC82), so kann man keine deutliche Veränderung der Promoteraktivität beobachten. Mutiert man im Kontext von pC82 (-35 Region 17 bp von 5'-TAGGAT-3') das Motiv 5'-TAGGAT-3' zu 5'-GCGGAT-3' (pC81) so sinkt die CAT Aktivität um einen Faktor 25. Dagegen verringert sie sich durch identische Mutationen im Wildtyp (-35 Region 25 bp von 5'-TAGGAT-3') nur um einen Faktor acht (pC4). Die erhöhte Verringerung im Fall von pC81 zeigt deutlich, daß bei einer Distanz von 17 bp zwischen der -35 Box und dem Motiv 5'-TAGGAT-3' tatsächlich letzteres als -10 Region fungieren kann.

3. Ergebnisse

A

Plasmid	Sequenz des Minimalpromotors	CAT Einheiten bei SL
	<div> <div>- 3 5</div> <div>- 1 6</div> <div>- 1 0</div> <div>*</div> </div>	
WT	CTTTGAAATTCGGGATCTAAGTGTTTCAGGCAATAGGATATGATTGGTGTCA	409,4 ± 20,7
pC5GC.....	3,5 ± 0,8
pC6CG.....	3,9 ± 0,7
pC7GC.....	62,7 ± 12,6
pC1	..CCATCT.....	405,7 ± 34,8
pC2ΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔ.....	1319,8 ± 81,2
pC22	..CCATCT.....ΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔ.....	418,8 ± 43,7
pC3GATTTCACAAGTC.....	377,6 ± 32,6
pC21ΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔΔ.....GC.....	8,9 ± 1,1
pC4GC.....	51,3 ± 4,9
pC41CC.....	130,6 ± 3,3
pC42CC.....	57,2 ± 2,9
pC82ΔΔΔΔΔΔΔΔ.....	359,3 ± 20,7
pC8ΔΔΔΔΔΔΔΔ.....GC.....	136,3 ± 6,1
pC81ΔΔΔΔΔΔΔΔ.....GC.....	16,1 ± 2,7

B

	- 1 6	- 1 0		
caaTagGaTATgATtggtg	gap2	S.6803	diese Arbeit	
aatTcTGA TAGAATtcata	prk	S.6803	(van Thor et al., 1998)	
cagcgTGA TAGcgctt	atp1	S.6803	(Lill und Nelson, 1991)	
atcTgTGggAagATaaagc	psbBII	A.7120	(Lang und Haselkorn, 1989)	
aatTgTGcTAaAATactaa	N-1 II	A.7120	(Schneider u. Haselkorn, 1988)	
ggaTaTGtcAcAATgaggg	ndhF	S.7002	(Schluchter et al., 1993)	
cccTgcGgTAaAcTaacc	psaC	S.7002	(Rhiel et al., 1992)	
ctgcgTGA TAGgATtacc	atp1	S.6301	(Cozens und Walker, 1987)	
tttTgTGgTAAATatg	psbA	C.reinhardtii	(Ishikura et al., 1999)	
tatTaTGcTAAATataaa	atpA	C.reinhardtii	(Ishikura et al., 1999)	
gtcTaTGTATAcTgttaa	psbA	Weizen	(Satoh et al., 1999)	
TrTGrTAAAT	Konsensus			

Abb. 17. Analyse von Elementen des *gap2* Minimalpromotors

A Analyse des *gap2* Minimalpromotors mittels Mutationen und Deletionen.

Reporter-Stämme, die durch Mutation und Deletion veränderte Derivate des Konstrukts pT1 besitzen, sind zusammen mit den entsprechenden CAT-Aktivitäten dargestellt. Versuchsbedingungen sind in Material und Methoden beschrieben. Identische Basen sind als Punkte dargestellt, mutagenisierte Basen sind blau gekennzeichnet. Δ bezeichnet eine deletierte Base. Die vermeintlichen -10, -16 und -35 Regionen sind durch Balken und der Transkriptionsstart (+1) durch einen Stern gekennzeichnet.

B Sequenz Alignment von -16/-10 Regionen und Umgebung von verschiedenen Genen aus Cyanobakterien, Cyanophage, Grünalgen und Pflanzen.

Abkürzungen sind wie folgt: *Anabaena* PCC7120 (A.7120), *Synechococcus* PCC7942 (S.7942), *Synechococcus* PCC7002 (S.7002), *Synechocystis* PCC6301 (S.6301) und *Synechocystis* PCC6803 (S.6803) und *Chlamydomonas reinhardtii* (C. reinhardtii). Hoch konservierte Nukleotide sind blau und als Großbuchstaben gekennzeichnet. Die Konsensussequenz der -16/-10 Region ist unten angegeben.

3.3. Konstruktion von Insertionsmutanten potentieller GAPDH Regulatorgene und deren phänotypische Analyse

3.3.1. Insertionsmutagenese des *rbcR1*, *rbcR2* und *lysR* Gens und Charakterisierung der Mutanten

In Proteobakterien, die teilweise ebenfalls den Calvin-Zyklus zur Fixierung von CO₂ einsetzen, werden Calvin-Zyklus-spezifische Gene in der Regel durch ein Regulatorprotein der LysR Familie transkriptioneller Regulatoren reguliert, das als CbbR (Calvin-Benson-Bassham-Zyklus-Regulator) bezeichnet wird (Gibson und Tabita, 1996). *Synechocystis* besitzt zwei CbbR Homologe RbcR1 (in der Datenbank des vollständig sequenzierten Genoms von *Synechocystis*, „Cyanobase“, wie folgt annotiert: sll0030, bzw. CmpR) und RbcR2 (sll1594), die entsprechend 49,2% und 50,5% Aminosäure-Identität zu ihrem nächsten Verwandten, dem CbbR Protein aus *Thiobacillus ferroxydans*, aufweisen. Untereinander besitzen die beiden Gene aus *Synechocystis* 53,2% identische Aminosäuren. Zusätzlich besitzt *Synechocystis* zumindest noch ein weiteres Regulatorgen der LysR-Familie, das in Cyanobase als „*lysR*“ (sll0998) indiziert ist. Dieses Gen ist interessanterweise auch in den Plastidengenomen (dort als YC30 bezeichnet) der Rotalge *Porphyra purpurea*, der Kieselalge *Odontella sinensis* und der zu den Glaucocystophyta gehörenden Alge *Cyanophora paradoxa* enthalten ([Stoebe et al., 1999] , hier allerdings als *rbcR* bezeichnet) und sehr hoch konserviert (70 bis 78% Identität). Um zu testen, ob eines dieser drei Genprodukte in *Synechocystis* eine Rolle in der Regulation der Calvin-Zyklus-Gene spielt, wurden Deletionsmutanten dieser drei Gene erzeugt. Alle untersuchten Mutanten der *rbcR* Gene waren unabhängig von den Anzuchtbedingungen (autotroph/photoheterotroph) vollständig segregiert. Im Gegensatz dazu segregierte keine *lysR* Mutante vollständig. Southern Analysen jeweils einer repräsentativen Mutante sind in Abb.18 zu sehen.

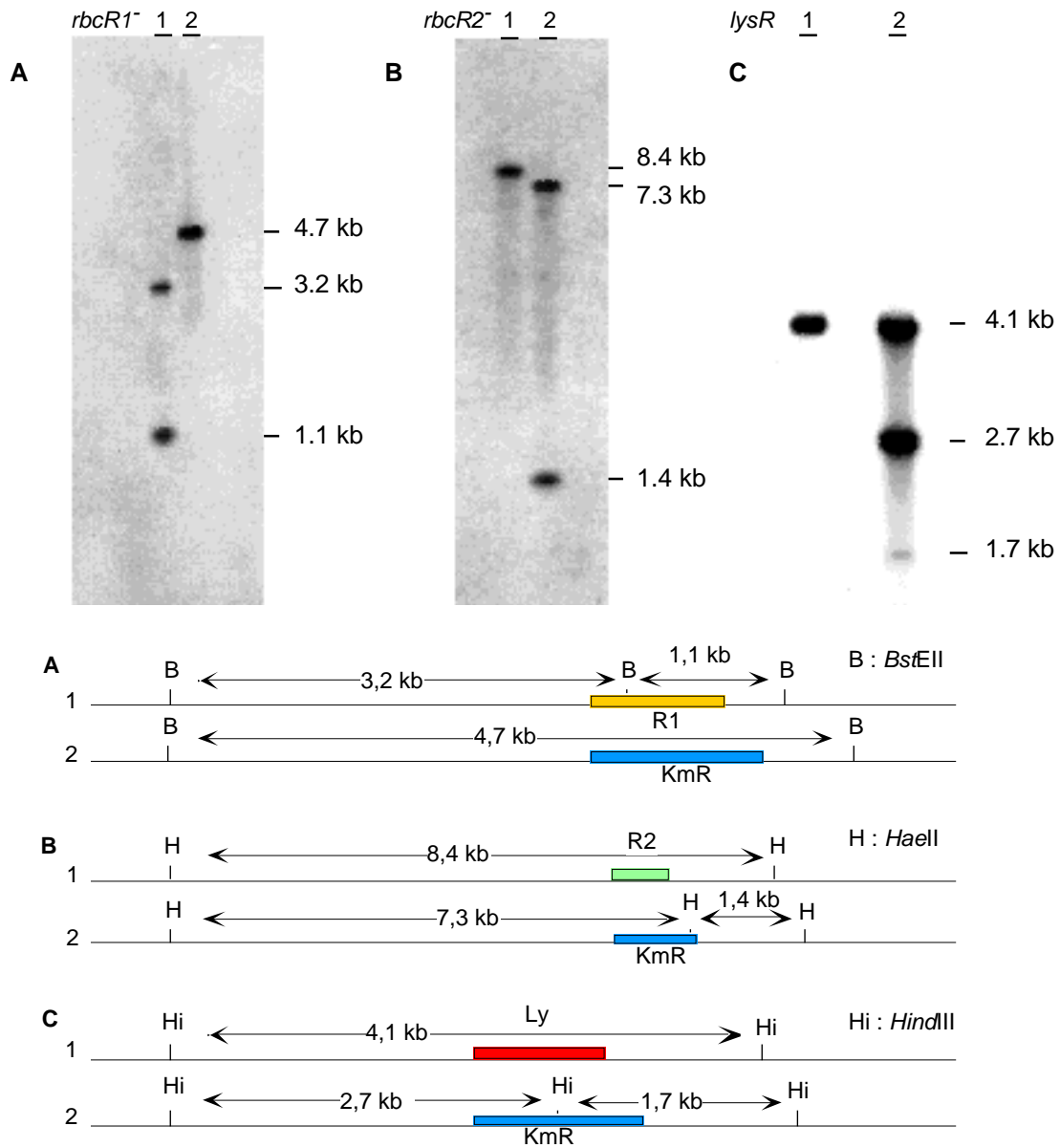


Abb. 18. Southern Analyse der Gene *rbcR1* (A), *rbcR2* (B) und *lysR* (C) in *Synechocystis* und schematische Darstellung der nach Restriktionsverdau erwarteten Fragmentgrößen.

DNA aus Wildtyp (1) und Mutanten (2) wurden nach Restriktionsverdau elektrophoretisch getrennt, geblottet und mit Sonden hybridisiert, die jeweils nur die Randbereiche der Gene (entsprechend Plasmiden pR1casg etc., siehe 2.9.) umfaßten, da die kodierenden Bereiche in den segregierten Mutanten deletiert sind. Entsprechende Fragmentgrößen sind in Kilobasenpaaren (kb) angegeben. Abkürzungen: H: *HaeII*, Hi: *HindIII*, B: *BstEII*, KmR: Kanamycin Resistenzkassette aus pUC4KSAC.

Aufgrund der unvollständigen Segregation wurde die *lysR* Mutante nicht weiter untersucht. Die *rbcR* Mutanten zeigten unter Standardbedingungen keinen Phänotyp. Die Expressionsraten der Gene *gap2* und *rbcL* wurden unter Verwendung transkriptioneller Fusionen der jeweiligen Gene in beiden Mutanten und dem Wildtyp ermittelt und sind in Tab. 1 vergleichend dargestellt.

Gen	Konstrukt	WT/CAT U	R1/CAT U	R2/CAT U
<i>gap2</i>	pT1	419	399	515
<i>rbcL</i>	prbcL1	1180	1684	1579
<i>rbcL</i>	prbcL3	89	109	125

Tab.1. CAT-Aktivitäten von *gap2* und *rbcL* Promotor-Konstrukten in Wildtyp (WT), *rbcR1* (R1) und *rbcR2* (R2) Mutante. *Synechocystis*-Kulturen wurden unter SL angezogen. Konstrukte prbcL1 und prbcL3 besitzen entsprechend Fragmente -350;-207 und -350;-1 jeweils vom Translationsstart des *rbcL* Gens.

Es ergaben sich keine drastischen Unterschiede (siehe Tab.1), die auf eine direkte transkriptionelle Steuerung des *gap2* oder der *rubisco* Gene durch RbcR1 oder RbcR2 hindeuten würden.

3.3.2. Transkriptionelle Analyse der drei Regulatorgene

Eine Northern Analyse der Transkripte der drei Regulatorgene *rbcR1*, *rbcR2* und *lysR* ergab folgendes Ergebnis: Keines der drei Gene wird im Dunkeln transkribiert. Unter Starklicht

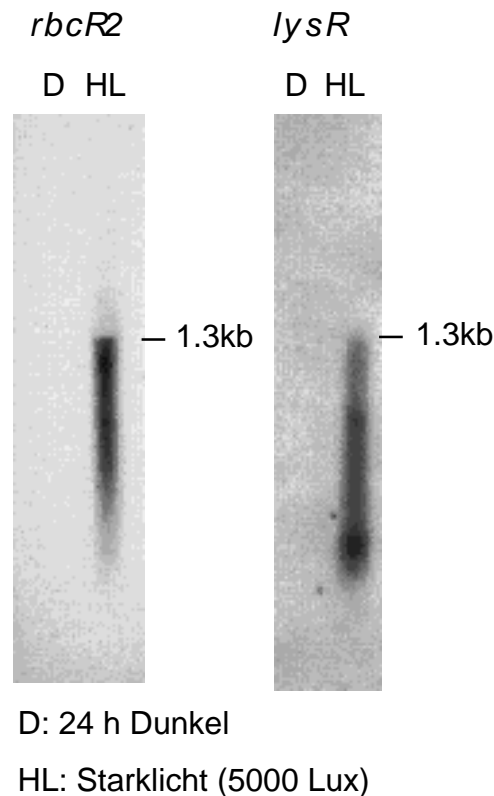


Abb. 19. Northern Analyse von *rbcR2* und *lysR* Transkripten aus *Synechocystis* Wildtyp. Versuchsbedingungen wurden in Abb. 6 beschrieben. Nach einer 24 h Dunkelphase (D) wurden die Zellen für 60 min unter starker Lichtintensität (HL) inkubiert und daraufhin aus ihnen RNA präpariert. Nach Northern Transfer wurde derselbe Filter zuerst mit einer *rbcR2* spezifischen Sonde hybridisiert, diese entfernt und daraufhin mit einer *lysR* spezifischen Sonde rehybridisiert.

(HL) konnten Transkripte für *rbcR2* und *lysR* nachgewiesen werden (Abb. 19), allerdings nicht für das *rbcR1* Gen (nicht gezeigt). Offensichtlich unterliegen die Transkripte der beiden Gene einem rapiden Abbau, da sie keine deutlichen Banden aufweisen, sondern als ausgezogener „Schmier“ in der Northern Analyse zu sehen sind.

3.3.3. Autoregulation des *rbcR2* Gens

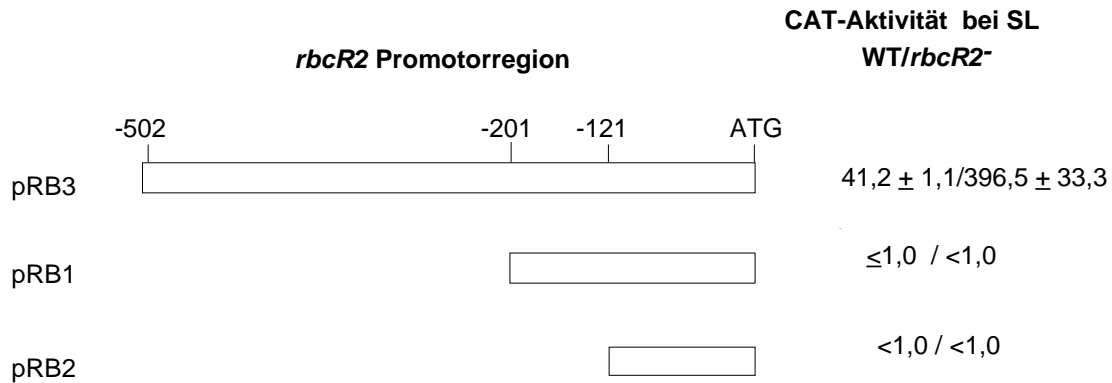


Abb. 20. *rbcR2-cat* transkriptionelle Fusionen und zugehörige CAT-Aktivitäten. Analyse von *rbcR2* Promotor-Bereichen, die in den Reportervektor pSB2A kloniert wurden. *Synechocystis* Stämme mit rekombinanten Plasmiden wurden wie in Material und Methoden beschrieben angezogen und ihre CAT-Aktivitäten in Wildtyp (WT) und *rbcR2* Mutante unter Standard-Lichtbedingungen (SL, 3000 Lux) bestimmt. Die Nummerierung der Konstrukte im *rbcR2* Promotor bezieht sich auf den Start der Translation (ATG Kodon).

Da Regulatoren der LysR Familie oft ihre eigene Transkription reprimieren, wurde die Promotoraktivität des *rbcR2* Gens sowohl im Wildtyp als auch der *rbcR2*⁻ Mutante getestet. Hierzu wurde ein 502 bp langes Fragment des *rbcR2* Promotorbereichs, das genau vor dem Translationsstart endet, in den Promotor-Test-Vektor pSB2A kloniert, in Wildtyp und Mutante konjugiert und CAT-Aktivitäten unter Standard-Lichtbedingungen (SL) ermittelt. Wie aus Abb. 20 ersichtlich, erhöht sich in der Mutante, also in Abwesenheit des zugehörigen Genprodukts, die Aktivität des Promotors (Konstrukt pRB3) um einen Faktor von 9,6. Um auszuschließen, daß diese Steigerung auf einem Rekombinations-Ereignis in der Mutante beruht - denkbar wäre z. B. eine Rekombination zwischen dem sowohl im Vektor als auch im Genom der Mutante befindlichen Kanamycin Resistenzgen - wurde genomische DNA aus WT und Mutante mittels Southern Analyse untersucht. Hybridisierung mit einer *cat*-spezifischen Sonde ergab keinen Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante (Daten nicht gezeigt).

Die Untersuchung der Konstrukte pRB1 und pRB2 zeigte, daß sich der eigentliche Promotor des *rbcR2* Gens mindestens 200 Basenpaare stromaufwärts vom Beginn der kodierenden Region befinden muß. Durch Konstruktion weiterer transkriptioneller Fusionen könnte die Bindestelle, die sich vermutlich, wie es für LysR Regulatoren typisch ist, in der Nähe des basalen Promotors befindet, charakterisiert werden.

4. Diskussion

4.1 Das GAPDH System als Indikator fundamentaler Evolutionsprozesse

Für den phylogenetischen Teil dieser Arbeit wurden GAPDH Sequenzen aus den zwei eubakteriellen Phyla Cyanobacteria und Spirochaetales kloniert und charakterisiert. Hintergrund waren in beiden Fällen Gentransfer-Ereignisse zwischen Primärreichen, die sich vermutlich zwischen den Vorfahren dieser Eubakterien und Eukaryoten abgespielt haben.

Vorausgegangene Arbeiten hatten gezeigt, daß GAPDH Sequenzen höherer Pflanzen aus den Genomen ihrer ursprünglich eubakteriellen Endosymbionten stammen, wobei das *GapC* Gen durch die mitochondriale und das *GapA* Gen durch die plastidäre Endosymbiose Eingang in das pflanzliche Genom fanden (Liaud et al., 1990; Martin et al., 1993; Liaud et al., 1994; Cerff, 1995; Henze et al., 1995). Um die Verwandtschaftsbeziehungen zwischen Cyanobakterien genauer aufzuklären und eine bessere Einordnung der Plastiden innerhalb der cyanobakteriellen Radiation zu ermöglichen, wurden in dieser Arbeit GAPDH Gene aus den Cyanobakterien *Gloeobacter violaceus*, *Prochloron didemni* und *Prochlorococcus marinus* kloniert und zusammen mit allen verfügbaren cyanobakteriellen und repräsentativen pflanzlichen GAPDH Sequenzen analysiert. Die ausgewählten Organismen sind von besonderem Interesse, da *Prochloron* und *Prochlorococcus* zu den wenigen cyanobakteriellen Gattungen gehören, die wie Pflanzen Chlorophyll b besitzen (Matthijs et al., 1994) und *Gloeobacter* aufgrund seiner Morphologie als das primitivste Cyanobakterium angesehen wird (Rippka et al., 1974).

Mittels phylogenetischer Analysen wurde eine nahe Verwandtschaft zwischen dem *gapI* Gen aus der Spirochaete *Treponema pallidum* und *GapC* Genen aus Spezies der Abteilung Euglenozoa entdeckt. Um den evolutionären Hintergrund dieser Verwandtschaft genauer aufzuklären, wurden weitere *gap* Gene aus neun verschiedenen Spirochaeten kloniert. Diese wurden zusammen mit den neu ermittelten cyanobakteriellen Sequenzen, allen derzeit verfügbaren eubakteriellen GAPDH Sequenzen und einer Auswahl an GAPDH Sequenzen aus Eukaryoten einer phylogenetischen Analyse unterzogen.

4.1.1. Eubakterielle GAPDH Gendiversität in Spirochaeten: Genduplikation im gemeinsamen Vorfahren oder Cladogenese verbunden mit lateralem Gentransfer?

Eubakterien besitzen eine sehr hohe Diversität an GAPDH Genen, die in Phylogenien anderer Gene des Grundstoffwechsels ihresgleichen sucht (Forthergill-Gilmore und Michels, 1993; Martin und Schnarrenberger, 1997). So findet man in einigen Cyanobakterien drei und in Proteobakterien bis zu vier divergente *gap* Gene (*Vibrio cholerae*, durch Stern in Abb. 3 gekennzeichnet). Die Präsenz von mehreren *gap* Genen in einem Organismus läßt keinen Zweifel daran, daß es sich um paraloge Gene handelt. Im Gegensatz zu Proteo- und Cyanobakterien wurde in den vollständig sequenzierten Genomen der Spirochaeten *Treponema pallidum* und *Borrelia burgdorferi* (Fraser et al., 1997; Fraser et al., 1998) und in allen hier untersuchten Spirochaeten jeweils nur ein *gap* Gen gefunden. Dennoch treten spirochaetale *gap* Gene an fünf deutlich voneinander getrennten Hauptästen im GAPDH Baum auf (siehe Abb. 3). Diese Verteilung kann nicht der organismischen Evolution der Spirochaeten entsprechen, da aufgrund morphologischer und molekularer Daten ein monophyletischer Ursprung aller Spirochaeten als gesichert gilt (Holt, 1978; Woese, 1987). Somit besitzen offensichtlich auch Spirochaeten eine hohe Diversität an *gap* Genen und man fragt sich, wann und wie diese entstanden ist? Zwei Extremszenarien sind denkbar, die sich hinsichtlich des Mechanismus und des Zeitraums der Entstehung der heute beobachteten Diversität unterscheiden. (i) Die GAPDH Gendiversität entstand durch multiple Genduplikationen schon im gemeinsamen Vorfahren aller Spirochaeten und möglicherweise sogar aller Eubakterien und ging zu einem großen Teil nach der Entwicklung der Phyla differentiell verloren oder (ii) der spirochaetale bzw. eubakterielle Vorfahr enthielt nur ein GAPDH Gen und die Diversität entstand durch Cladogenese der bakteriellen Phyla und nachfolgenden lateralen Gentransfer.

Unter Annahme von Szenario (i) sollte man erwarten, daß jeder GAPDH Teilbaum jeweils die eubakterielle Phylogenie (Woese, 1987) widerspiegelt, was wir auch im Gap-I Teilbaum ansatzweise beobachten können (vergleiche Abb. 1, S.2 mit Abb. 3, S.26). Die Präsenz von mehreren *gap* Genen, insbesondere in Proteo- und Cyanobakterien, könnte als ursprüngliche Situation und damit als weiterer Hinweis für die Richtigkeit von (i) angesehen werden. Ein drittes Argument für (i) ist die extreme Länge einiger basaler Äste im GAPDH Baum (Abb. 3), die auf

eine zumindest zeitweise erhöhte Evolutionsrate hindeutet. Diese Beschleunigung beruht oft auf einer Relaxation des Funktionsdruckes, der auf Gene wirkt, die funktionelle Proteine kodieren. Ein derartiges Phänomen tritt insbesondere bei Duplikationen von Genen auf, da eines der beiden Gene dann meistens funktionell redundant ist und Mutationen akkumulieren kann (siehe auch unten). Somit spricht die Länge der Äste der GAPDH Teilbäume ebenfalls für eine Entstehung der Gene durch Genduplikationen, die aufgrund der basalen Positionen der zugehörigen Äste vermutlich schon relativ früh in der eubakteriellen Evolution stattgefunden haben.

Szenario (ii) setzt voraus, daß es nach der Cladogenese der einzelnen eubakteriellen Phyla zu einem massiven Austausch von Genen und erst damit zur Entstehung von Paralogie kam. Die Präsenz von jeweils nur einem, innerhalb der Spirochaeten aber unterschiedlichen *gap* Gen pro Organismus, spricht eindeutig für (ii), da unter Annahme von (i) mindestens vier unterschiedliche *gap* Gene in jeder Spirochaetengattung verlorengegangen sein müßten. Ein weiteres Argument für (ii) besteht darin, daß lateraler Gentransfer in Bakterien insbesondere im Falle von operationalen Genen (die Proteine für Biosynthese, Metabolismus und Regulation kodieren), wie GAPDH, offensichtlich mit hoher Frequenz stattfindet (Lawrence und Ochman, 1998; Rivera et al., 1998; Jain et al., 1999).

Da beide Extremszenarien durch die hier dargestellten Daten unterstützt werden, muß angenommen werden, daß die Wahrheit in ihrer Mitte liegt. Man könnte sich also den eubakteriellen und damit auch spirochaetalen Vorfahr als komplexe Zelle mit relativ hohem Maß an genetischer Redundanz, d. h. mit mehreren paralogen GAPDH Genen, oder sogar als mehr oder weniger heterogene Zellpopulation mit interzellulärem Austausch genetischen Materials vorstellen. Der Weg zur heutigen Situation ist durch deutlichen Verlust dieser Redundanz gekennzeichnet. So müssen gerade in den Genomen der Spirochaeten mehrere Gene verlorengegangen sein. Die heutige GAPDH Diversität ist mit Sicherheit aber nicht nur ursprünglich, sondern wurde während der bakteriellen Evolution durch Genduplikationen und durch Cladogenese verbunden mit lateralem Gentransfer noch vergrößert. Es ist anzunehmen, daß unser derzeitiges Bild nur die Spitze des Eisberges der tatsächlich vorhandenen Gendiversität darstellt, die seit der Trennung der Eubakterien von den Archaeobakterien entstanden ist.

Warum aber wurde eine derartige Gendiversität erhalten? *A priori* möchte man vermuten, daß genetische Redundanz aufgrund fehlender Selektion verlorengehen müßte. In manchen Fällen

bringt die Präsenz mehrerer Kopien desselben Gens aber auch Vorteile für die Zelle. So liegen in vielen Organismen multiple RNA-Operone vor, die durch die Erhöhung der Gendosis dem Organismus einen Vorteil verschaffen (Li, 1997). Im Fall von GAPDH könnte dies z. B. in *Bacillus subtilis* oder in *Helicobacter pylori* der Fall sein, da diese Organismen zwei relativ ähnliche, vermutlich rezent duplizierte Kopien jeweils eines Gens besitzen. Divergente Kopien eines Gens, wie wir sie im Fall der GAPDH hauptsächlich beobachten, können für die Zelle ebenfalls einen Vorteil bedeuten. Nach einer Genduplikation akkumulieren meist in einer der beiden Kopien Mutationen (siehe oben), die sich in den meisten Fällen nachteilig auf das Protein auswirken, so daß es schließlich als Pseudogen verlorengelht (negative Selektion). Allerdings können diese Mutationen auch vorteilhaft für die Zelle sein. Dies ist insbesondere dann der Fall, wenn die Mutationen dem Protein eine neue Funktion verleihen. Solche positiven Mutationen werden solange selektiert, bis die neue Genfunktion optimiert ist (positive Selektion, [Li, 1997]). Letzterer Mechanismus könnte z. B. im Fall der GapB aus *E. coli* zu ihrer veränderten Substratspezifität (Erythrose-4-phosphat Dehydrogenase [Zhao et al., 1995]) und in Gruppe A Streptokokken zur Verwendung von GAPDH als ADP-ribosylierendes Oberflächenprotein (Pancholi und Fischetti, 1993) geführt haben. Insbesondere auch in Eukaryoten sind mannigfaltige zusätzliche Funktionen von GAPDH Genen bekannt (siehe Übersichtsartikel, Sirover, 1999). In *Vibrio cholerae*, dem derzeit einzigen Bakterium, das vier GAPDH Gene besitzt, wurde kürzlich ein interessanter, dem der Antibiotika-Resistenzen übertragenden Integrons sehr ähnlicher Mechanismus entdeckt, der eine bedeutende Rolle im Transfer von Pathogenitätsinseln spielt, vielleicht aber auch den Erwerb der zusätzlichen GAPDH Kopien ermöglicht hat (Mazel et al., 1998). Ob alle vier GAPDH Gene eine Rolle in diesem Bakterium spielen, ist eine interessante, aber noch unbeantwortete Frage.

4.1.2. Gentransfer-Ereignisse zwischen und innerhalb eubakterieller Phyla

Abb. 3 birgt zumindest zwei deutliche Gentransfer-Ereignisse zwischen eubakteriellen Phyla (durch schwarze Dreiecke bezeichnet). So befinden sich zum einen Gap-I Sequenzen von *Ralstonia solanacearum* und *Bacteroides fragilis* und zum anderen Gap-IV Sequenzen von *Escherichia coli* und *Lactobacillus delbrueckii* jeweils gemeinsam an deutlich unterstützten Ästen (entsprechend 99% und 93% Bootstrap-Unterstützung und 80% und 65% identischen Aminosäuren). Diese sehr nahe Verwandtschaft zwischen Genen, die aus Spezies unterschiedlicher bakterieller Phyla stammen, entspricht vermutlich nicht der organismischen Evolution und ist wahrscheinlich das Ergebnis zweier Gentransfer-Ereignisse. *Bacteroides fragilis* erhielt offensichtlich ein *gap* Gen von einem β -proteobakteriellen Vorfahren, da seine Gap1 Sequenz deutlich näher mit der β -proteobakteriellen Gap Sequenz von *Ralstonia solanacearum* (80% Identität) verwandt ist als mit γ -proteobakteriellen Sequenzen (ca. 70%). Die Richtung des Gentransfers zwischen *E. coli* und *Lactobacillus* kann aufgrund der vorliegenden Daten nicht ermittelt werden. Der Gap-IV Teilbaum läßt keine eubakterielle Phylogenie erkennen und könnte deshalb noch weitere weniger offensichtliche Gentransfer-Ereignisse beinhalten.

Die Gattung *Treponema* bildet in einer 16S rRNA Phylogenie keine deutlich unterstützte monophyletische Gruppe [Paster, 1991 #830]. Dadurch kann aber eine Divergenz von GAPDH Genen, wie sie in den Spezies *T. pallidum*/*T. denticola* (beide Typ-I) im Vergleich zu *T. saccharophilum* (Typ-IV) auftritt, nicht erklärt werden (Abb. 3). Es könnte sich hier also auch um einen relativ rezenten Gentransfer handeln, der nach der Entstehung der Gattung *Treponema* erfolgte. Anderweitig könnte die Gattung *Treponema* ursprünglich beide paralogene Gene besessen haben, die dann differentiell verloren gingen. Interessanterweise unterscheiden sich die Genome der *Treponema* Spezies erheblich in ihrer Größe, so ist z. B. das Genom der Spezies *T. pallidum* (1040 kb, [Walker et al., 1995]) um den Faktor drei kleiner als das der Spezies *T. denticola* (3000 kb, [MacDougall, 1995 #847]). Unterschiede der Genomgrößen zwischen spirochaetalen Genera erreichen mit *Borrelia burgdorferi* (910 kb [Casjens et al., 1995]) gegenüber *Leptospira interrogans* (4500 kb [Zuerner, 1991; Zuerner et al., 1993]) sogar einen Faktor von fünf. Diese drastischen Differenzen bezeugen, daß das ursprüngliche Spirochaetengenom offensichtlich massiv reorganisiert wurde. Insbesondere in pathogenen/kommensalen

Spirochaeten (zumindest 5 von 12 vorliegenden) wurde durch einen „streamlining process“ des Genoms, der oft in derartigen Organismen zu beobachten ist (Andersson und Kurland, 1998), die Genomgröße erheblich reduziert.

4.1.3. Ist *Gloeobacter* ein ancestrales oder sehr stark abgeleitetes Cyanobakterium?

Phylogenetische Analysen von 16S rRNA, *tufA*, *atpB* und *psbA* Daten deuten auf eine massive cyanobakterielle Radiation hin, die sich relativ spät in der eubakteriellen Evolution vollzogen haben muß (Morden et al., 1992; Douglas, 1994; Nelissen et al., 1995). *Gloeobacter* befindet sich an einer relativ basalen Position innerhalb der Cyanobakterien, wenn man 16S rRNA (Wilmotte, 1994; Nelissen et al., 1995) und *tufA* Daten (Kohler et al., 1997) analysiert. Diese Position steht im Einklang mit der einzigartigen Morphologie dieses Cyanobakteriums, das keine Thylakoide besitzt (Rippka et al., 1974), sich durch das Fehlen von Sulfoquinovosyl Diacylglycerin in der Membran auszeichnet (Selstam und Campbell, 1996) und eine außergewöhnliche Struktur und Lokalisation der Phykobilisomen (Guglielmi et al., 1981) aufweist. Ein frühes Abzweigen von *Gloeobacter* wird von der phylogenetischen Analyse der *gap2* Sequenzen ebenfalls bestätigt, allerdings nur in Präsenz einer Außengruppe zum *gap2* Baum. Fehlt diese, so bildet *Gloeobacter* mit *Anabaena* einen schwach unterstützten Ast (Abb. 5D). Zudem weist der Gap-I Baum auf eine sehr nahe Verwandtschaft dieser beiden Organismen hin. Unter der Annahme, daß *Gloeobacter* tatsächlich das ursprünglichste Cyanobakterium ist, kann die erhaltene Gap-I Phylogenie nur durch einen horizontalen Gentransfer einer Gap1 Sequenz von *Anabaena* zu *Gloeobacter* erklärt werden. Im Gegensatz dazu könnte *Gloeobacter* auch ein sehr stark abgeleitetes Cyanobakterium sein und seine Position im Gap-I Teilbaum seiner tatsächlichen Evolution entsprechen. Seine Position im Gap-II Teilbaum wäre dann vermutlich auf ein Rekonstruktionsartefakt der verwendeten phylogenetischen Methode zurückzuführen. Diese Annahme widerspricht allerdings der bisher gängigen Meinung zur Position von *Gloeobacter* (siehe oben). Für die genaue Klärung der Position von *Gloeobacter*

sind weitere Analysen mit anderen molekularen Markern oder ganzen cyanobakteriellen Genomen erforderlich.

4.1.4. Eubakterielle *gap1* Gene sind die Vorfahren der kernkodierten *GapC* Gene in Eukaryoten.

In Abb. 3 findet man eukaryotische GAPDH Gene an fünf verschiedenen Positionen innerhalb der eubakteriellen Phylogenie (graue Dreiecke). Am Gap-I Teilbaum erscheinen GAPDH Sequenzen aus Eukaryoten an drei deutlich voneinander getrennten Positionen, entsprechend der klassischen glykolytischen GapC der meisten Eukaryoten, der glykosomalen und der cytosolischen GapC der Trypanosomen. Die GapA Sequenzen der photosynthetischen Eukaryoten befinden sich am Gap-II Teilbaum und die GAPDH Sequenzen der Parabasalia lassen sich keinem definierten Teilbaum zuordnen. Das Auftreten der Eukaryoten als terminale Äste der eubakteriellen Linien legt einen eubakteriellen Ursprung aller eukaryotischen GAPDH Gene nahe, der mit der Entstehung der eukaryotischen Gendiversität in Einklang steht (Martin und Müller, 1998).

Basierend auf Vergleichen der enzymatischen Ausstattung (z. B. Atmungskette in Mitochondrien und α -Proteobakterien) und phylogenetischen Analysen kann ein α -proteobakterieller Ursprung der Mitochondrien als sehr wahrscheinlich angenommen werden (Gray, 1992). Am Gap-I Teilbaum (Abb. 3) finden sich β - und γ -proteobakterielle Sequenzen zusammen mit eukaryotischen Homologen (GapC) an einem stark unterstützten gemeinsamen Ast (97% Bootstrap-Unterstützung), der nur wenige Gap1 Sequenzen anderer Phyla beinhaltet. Die einfachste Erklärung für diese Position der eukaryotischen GapC Sequenzen führt ihren Ursprung auf den mitochondrialen Vorfahren, ein α -Proteobakterium, zurück. Bisher sind zwar keine Gap1 Homologen in α -Proteobakterien beschrieben worden, aber obige Annahme legt nahe, daß diese in absehbarer Zeit gefunden werden dürften.

Die Gap1 Sequenzen aus den Spirochaeten *B. hyodysenteriae*, *S. murdochii*, *T. pallidum* und *T. denticola* und GapC Sequenzen der Euglenozoen liegen zusammen auf einem Ast des Gap-I

Baums, der mit einem 100% Bootstrap-Wert unterstützt wird, und diese Sequenzen damit deutlich von allen anderen Gap1/GapC Sequenzen abhebt (Abb. 3). Zudem besitzen die Sequenzen dieser Organismen drei spezifische Insertionen, was darauf hindeutet, daß diese GAPDH Gene einen gemeinsamen Ursprung haben, der unabhängig von der mitochondrialen Endosymbiose ist (siehe Abb. 4 und unten).

Während die Mehrzahl der Eukaryoten, ja sogar amitochondriale Diplomonaden wie *Giardia lamblia* (nicht gezeigt), glykolytische GAPDH Enzyme vom Typ Gap-I besitzen, die vornehmlich mitochondrialen Ursprungs sind, besitzen Parabasalia eine glykolytische GAPDH, die eindeutig nicht von einer eubakteriellen Gap1 Sequenz abstammt. Viscogliosi und Müller (1998) finden eine lose Verbindung zwischen Sequenzen dieser Abteilung und dem Gap-III Teilbaum. Abb. 3 zeigt eine lose Assoziation der Parabasalia mit den beiden GAPDH Sequenzen aus den Spirochaeten *B. burgdorferi* und *B. hermsii*. Das Fehlen eines homologen bakteriellen Gens könnte folgende Gründe haben. (i) Möglicherweise wurde die entsprechende, zu GAPDH Sequenzen der Parabasalia homologe, eubakterielle (oder archaeobakterielle) GAPDH Sequenz noch nicht gefunden. (ii) Parabasalia besitzen eine ursprünglich eukaryotische GAPDH. (iii) Die stark beschleunigte Evolutionsrate dieser Sequenzen verhindert eine genaue Zuordnung in phylogenetischen Analysen. Szenarien (i) und (iii) können beide nicht ausgeschlossen werden. Szenario (ii) steht dagegen nicht in Einklang mit der derzeit plausibelsten Erklärung zur Entstehung der Eukaryoten. Das Eukaryotengenom ist offensichtlich als Synthese eines archaeobakteriellen und eubakteriellen Genoms zu betrachten, wobei aus ersterem insbesondere der genetische Apparat und aus letzterem die Gene, die Enzyme des Grundstoffwechsels kodieren, stammen (Zillig et al., 1989; Martin und Müller, 1998). Deshalb gibt es eigentlich keine ursprünglich eukaryotischen Gene im engeren Sinne, und die GAPDH Sequenzen aus Parabasalia sind mit großer Wahrscheinlichkeit auch (eu- oder archae-) bakteriellen Ursprungs.

4.1.5. Ist die glykosomale GAPDH der Euglenozoa spirochaetalen Ursprungs?

Die glykosomale GAPDH Sequenz der Trypanosomen (cytosolisch in *Euglena*) bildet die tiefste Verzweigung am Gap-I Teilbaum, was einen mitochondrialen Ursprung dieses Enzyms unwahrscheinlich erscheinen läßt. Die zwei Klassen der Euglenozoa, repräsentiert durch *Euglena* (Euglenoidea) einerseits und *Trypanosoma*, *Leishmania* und *Herpetomonas* (Kinetoplastida) andererseits, unterscheiden sich hinsichtlich der Lokalisation ihrer glykolytischen Enzyme. Während bei *Euglena* die Glykolyse im Cytosol stattfindet, läuft diese in Kinetoplastiden im Glykosom ab, einem Organell, das nur aus diesen Organismen bekannt ist (Michels et al., 1997). Interessanterweise bilden glykosomale GAPDH Sequenzen aus Trypanosomen und die cytosolische GAPDH aus *Euglena* einen relativ stark unterstützten gemeinsamen Ast, der auf einen gemeinsamen Ursprung und gleichzeitig auf einen Rekompartmentierungsprozeß der GAPDH Enzyme hindeutet (Henze et al., 1995; Wiemer et al., 1995). Zudem besitzen Trypanosomen ein weiteres, distinktes Isoenzym im Cytosol (Michels et al., 1991; Hannaert et al., 1992), das eine extrem nahe Verwandtschaft zu enterobakteriellen Gap1 Sequenzen zeigt und vermutlich durch rezenten, lateralen Gentransfer von Pro- zu Eukaryoten in das Kinetoplastiden-Genom gelangte (Henze et al., 1995). Der γ -proteobakterielle Ursprung dieser Sequenzen wird durch die Position der Gap1 Sequenz aus dem β -Proteobakterium *Ralstonia solanacearum*, das eine Außengruppe zu der γ -proteobakteriellen/Trypanosomen Gruppierung bildet (Abb. 3), noch weiter untermauert. Diese basale Position von *Ralstonia*, zusammen mit dem Fehlen des paralogen cytosolischen Enzyms in den tiefer abzweigenden Kinetoplastiden (*Trypanoplasma*, wie in [Wiemer et al., 1995] beschrieben), legt nahe, daß der laterale Gentransfer vor relativ kurzer Zeit in der Evolution der Trypanosomen stattgefunden haben muß.

Im Gegensatz zur cytosolischen GapC von *Trypanosoma*, die von einer γ -proteobakteriellen Gap1 abstammen scheint, wird im Gap-I Teilbaum (Abb. 3) eine sehr nahe Verwandtschaft (100% Bootstrap-Unterstützung) zwischen den Gap1 Sequenzen aus den spirochaetalen Spezies *B. hyodysenteriae*, *S. murdochii*, *T. denticola* und *T. pallidum* und der in Trypanosomen glykosomalen GapC Sequenz deutlich. Daß diese Sequenzen einen gemeinsamen Ursprung

besitzen, wird zudem noch durch die Präsenz spezifischer gemeinsamer Sequenzsignaturen bestätigt (siehe Abb. 4). Diese nahe Verwandtschaftsbeziehung legt ein Gentransfer-Ereignis zwischen Spirochaeten und den Euglenozoa nahe. In welcher Richtung aber, von Pro- zu Eukaryoten oder umgekehrt, und in welchem biologischen Kontext fand dieser Transfer statt? Fälle, in denen Gene von Eukaryoten zu Prokaryoten übertragen wurden, sind rar und meistens sehr umstritten (als Überblicksartikel siehe [Doolittle, 1998]). (i) Nimmt man trotzdem an, daß ein entsprechender Transfer stattgefunden hat, sieht man sich ebenso wie im Fall der Parabasalia (siehe 4.1.4.) mit der Frage des Ursprungs der eukaryotischen GapC in Euglenozoa konfrontiert. Die Existenz eines ursprünglich eukaryotischen GAPDH Gens scheint im Hinblick auf den Ursprung der Eukaryoten selbst und damit einem Großteil ihrer Enzyme des Grundstoffwechsels nicht haltbar (Martin, 1999). Abb. 3 macht außerdem deutlich, daß die eukaryotischen GAPDH Sequenzen wie „aufgepfropft“ nur an den Spitzen der eubakteriellen Phylogenie zu finden sind, was ebenso gegen eine ursprünglich eukaryotische Herkunft dieser GapC Sequenzen spricht. Auch sind keine Mechanismen bzw. kein klarer biologischer Hintergrund bekannt, der einen Eu- zu Prokaryoten Gentransfer wahrscheinlich macht. (ii) Ganz im Gegensatz dazu sind Transferereignisse in umgekehrter Richtung im Rahmen des endosymbiotischen Gentransfers für viele Fälle dokumentiert (Martin et al., 1998) und scheinen auch insbesondere bei Eukaryoten, die Bakterien fressen (wie z. B. einige Trypanosomen) mit relativ hoher Wahrscheinlichkeit vorzukommen (Doolittle, 1998). Da die GAPDH Sequenzen von Spirochaeten innerhalb der eubakteriellen Phylogenie verstreut sind (siehe oben), kann aufgrund ihrer Position kein Schluß hinsichtlich der Richtung des Gentransfers gezogen werden. Eine vergleichsweise höhere GAPDH Diversität in Eubakterien als in Eukaryoten, die Position der Eukaryoten in der eubakteriellen Phylogenie und ein plausibler biologischer Hintergrund für den Gentransfer favorisieren aber Szenario (ii), in welchem die Euglenozoa ein *gap* Gen von einem spirochaetalen Vorfahren erhielten.

4.1.6. Sind Prochlorophyta die direkten Vorfahren der Chloroplasten?

Es besteht kein Zweifel daran, daß Eukaryoten ihre Photosynthesemaschinerie durch die Aufnahme eines cyanobakteriellen Vorfahrs erhielten, der sich dann zur Plastide entwickelte (Gray und Doolittle, 1982). Zudem unterstützen die meisten Untersuchungen einen monophyletischen Ursprung aller Plastiden, die einer primären Endosymbiose entstammen (Gray, 1992; Martin et al., 1992; Loiseaux-de Goer, 1994; Delwiche und Palmer, 1997). Die phylogenetische Analyse der Gap-II Sequenzen bestätigt ebenfalls einen monophyletischen Ursprung aller primären Plastiden innerhalb der cyanobakteriellen Radiation (Abb. 3, 5C).

Photosynthetische Organismen besitzen eine Vielzahl akzessorischer Pigmente, auf denen früher ihre Klassifikation fußte. Prochlorophyten enthalten wie Grünalgen und Landpflanzen Chlorophyll b und galten deshalb lange Zeit als die unmittelbaren Vorfahren der Chloroplasten (Lewin und Withers, 1975; Morden und Golden, 1989). Die Analyse ihrer zugehörigen kleinen ribosomalen RNA Sequenzen und der RNA Polymerase β' -Untereinheiten legte aber nahe, daß Prochlorophyten nur diversifizierte Cyanobakterien sind und sich an mehreren diskreten Positionen in der cyanobakteriellen Phylogenie befinden (Palenik und Haselkorn, 1992; Urbach et al., 1992). Die Analyse der Gap2 Sequenzen der Prochlorophyten, *Prochloron didemni* und *Prochlorococcus marinus*, die innerhalb der anderen cyanobakteriellen Sequenzen deutlich voneinander getrennt sind (siehe Abb. 3), unterstützt dieses Bild. Kürzlich konnte gezeigt werden (Tomitani et al., 1999), daß der gemeinsame Vorfahr aller Cyanobakterien vermutlich, wie das noch heute in *Prochlorococcus marinus* der Fall ist (Hess et al., 1996), beide Pigmentsysteme, Chlorophyll b und Phycobilisomen, enthielt. Somit ist dieses Merkmal kein phylogenetisch bedeutsames Kriterium und, wie im Gap2 Teilbaum nochmals verdeutlicht ist, sind Prochlorophyten weder untereinander noch mit Pflanzen näher verwandt als alle anderen Cyanobakterien.

4.1.7. Die Position von *Euglena* als Artefakt der phylogenetischen Analyse

Die Position der *Euglena* GapA Sequenz in Abb. 5C steht im Widerspruch zu der von Gibbs formulierten Hypothese (Gibbs, 1978), die annimmt, daß Plastiden in *Euglena* aus einer eukaryotischen Grünalge hervorgegangen sind, die von einem nicht-photosynthetischen Wirt aus der Klasse der Kinetoplastiden phagozytiert wurde. Phylogenetische Analysen der vollständig sequenzierten Plastidengenome unterstützen deutlich den chlorophytischen Ursprung der Plastiden in *Euglena* (Martin et al., 1998). Deshalb ist es um so erstaunlicher, daß die GapA Sequenz aus *Euglena* vor allen cyanobakteriellen GAPDH Sequenzen mit Ausnahme der *Gloeobacter* Gap2 Sequenz abzweigt (Abb. 5C). Dies zusammen mit dem schon früher beobachteten sehr langen Ast, an dem sich *Euglena* befindet (Henze et al., 1995) legt nahe, daß die Position der GapA aus *Euglena* auf einem phylogenetischen Rekonstruktionsartefakt, dem sogenannten „long branch artifact“ (LBA, für eine Beschreibung siehe 3.1.4) beruhen könnte (Felsenstein, 1978).

Verringert man die Anzahl der Außengruppen-Sequenzen (wie in Abb. 5B-D gezeigt), so bewegt sich die *Euglena* GapA Sequenz innerhalb des Gap-II Teilbaumes fortschreitend nach oben, um schließlich in Abwesenheit einer Außengruppe oberhalb der GapA Sequenz aus Rotalgen abzuzweigen. Diese Position stimmt deutlich besser mit den Daten der Chloroplasten-Genome überein, welche die Abstammung der Plastide von einer Grünalge bestätigen. Das GapA Gen in *Euglena* wurde somit von dem Genom des sekundären Endosymbionten (der Grünalge) in den Kern von *Euglena* übertragen. Das zugehörige Genprodukt wurde wiederum erfolgreich in die Plastide der Grünalge, das Kompartiment der Zelle, in dem es ursprünglich kodiert war, reimportiert. Diese Art der Relokalisation bei Organismen mit komplexen Endosymbiosen ist besonders bemerkenswert, da mit einer Ausnahme (Petersen, 1999) alle anderen bisher bekannten kernkodierten, plastidären GAPDH Enzyme von anderen sekundären Endosymbionten nicht der GapAB Genfamilie angehören, sondern duplizierte Gap1/GapC (Gap-I) Typen sind (Liaud et al., 1997).

4.2. Genregulation von GAPDH Genen im Cyanobakterium *Synechocystis* PCC6803

4.2.1. Redox-Regulation von *gap1* und *gap2* in *Synechocystis*

Die Untersuchung der Transkription der beiden *gap* Gene in *Synechocystis* zeigte, daß sie monocistronisch transkribiert werden, und daß die Menge an *gap2* Transkript deutlich über der von *gap1* liegt. Dieser Unterschied steht in Einklang mit den spezifischen Funktionen, die diese beiden Proteine in *Synechocystis* ausüben. Während die NAD/NADP bispezifische Gap2 ein Bestandteil des für Cyanobakterien essentiellen Calvin-Zyklus ist, arbeitet Gap1 ausschließlich im katabolen Abbau von Glukose, der vermutlich der Mobilisation von Reservestoffen dient (Koksharova et al., 1998). Beide *gap* Gene werden offensichtlich durch das Redoxpotential der Zelle transkriptionell reguliert. Im Fall des *gap2* Gens konnte gezeigt werden, daß seine Expression nur induziert wird, falls Elektronen von Photosystem I (PSI) auf nachfolgende Redoxcarrier übertragen werden (Abb. 21). Es wirkt also in diesem Fall nicht der Redoxzustand des Plastoquinonpools auf die Transkription, wie kürzlich für die Regulation der beiden Photosysteme in Chloroplasten beschrieben wurde [Pfannschmidt, 1999 #806], sondern vermutlich ein Faktor, der durch die von PSI abgegebenen Elektronen reduziert wird. Dieser Faktor (Abb. 21, RSR) könnte ein regulatorisches Protein sein, das, wie z. B. für den Fumarat-Nitrat-Regulator aus *E. coli* beschrieben (Kiley und Beinert, 1998), nur unter reduzierenden Bedingungen transkriptionsaktivierend wirkt. In *Synechocystis* werden Gene verschiedenster funktioneller Klassen (Stickstoffassimilation, Proteinsekretion, [Reyes und Florencio, 1995; Garcia-Dominguez und Florencio, 1997; Mazouni et al., 1998]) ebenfalls in Abhängigkeit vom Redoxpotential transkriptionell reguliert. Hier konnte gezeigt werden, daß der *gap2* Minimalpromotor (P) ausreichend für die Redox-abhängige Transkription ist (pT7 in Abb. 11). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, daß in Cyanobakterien ein globaler Redoxpotential-abhängiger Mechanismus existiert, der möglicherweise auch durch Modifikation eines Sigma-Faktors reguliert werden könnte (siehe hierzu Abb. 22). Gegen die Neusynthese

dieses Sigma-Faktors sprechen Experimente mit dem Translationsinhibitor Erythromycin, in dessen Präsenz *gap2* dennoch induziert werden kann (Abb. 8).

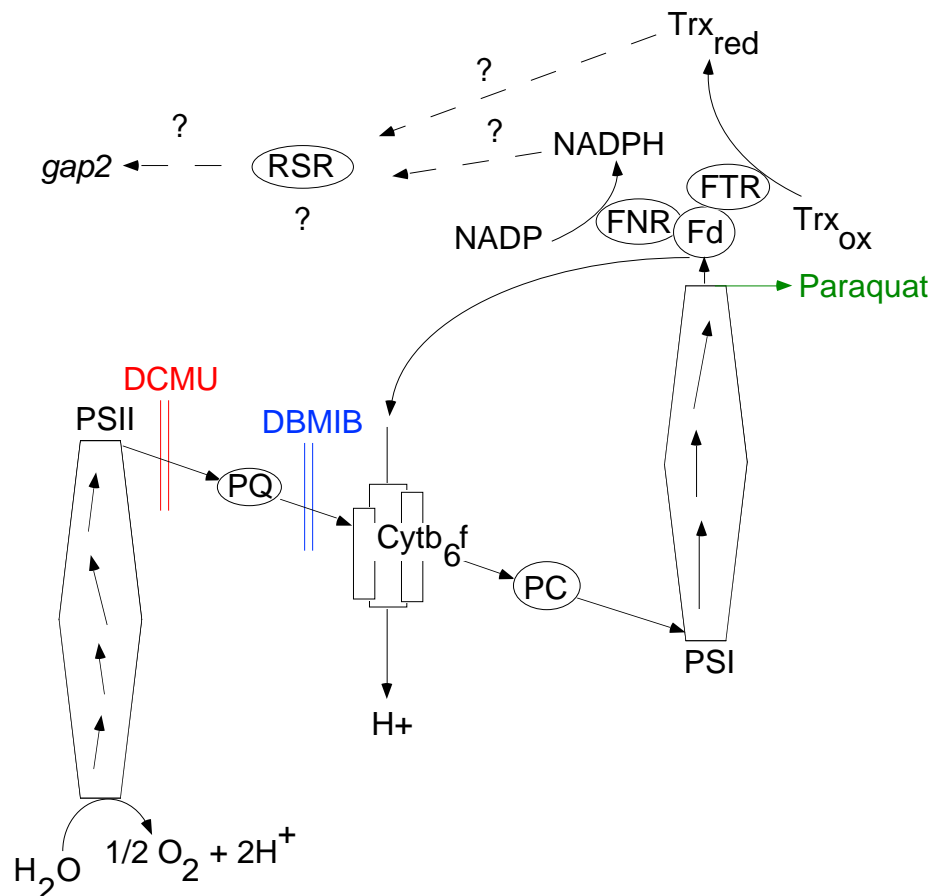


Abb. 21. Wirkorte photosynthetischer Elektronenfluß-Inhibitoren und Signaltransduktion zum *gap2* Gen.

Wirkorte der Inhibitoren des photosynthetischen Elektronentransports, DCMU, DBMIB und Paraquat, sind in verschiedenen Farben dargestellt. Die Transkription des *gap2* Gens wird nur induziert, wenn Elektronen PSI verlassen können. Diese werden möglicherweise über Ferredoxin NADP Oxidoreduktase (FNR) oder Ferredoxin Thioredoxin Reduktase (FTR) auf einen Transkriptionsfaktor (RSR: Redox Sensor Regulator) übertragen, der wiederum die Transkrip-

tion des *gap2* Gens induziert. Abkürzungen: PS, Photosystem; Trx, Thioredoxin; o, oxidiert; r, reduziert; PQ, Plastoquinon; PC, Plastocyanin; Cytb₆f, Cytochrom b₆f Komplex.

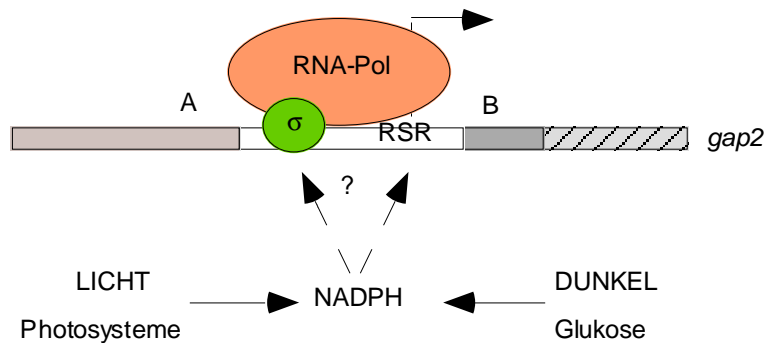


Abb. 22. Promotormodell zur redoxabhängigen Regulation des *gap2* Gens.

Ausgelöst durch Belichtung oder Zugabe von Glukose im Dunkeln steigt der NADPH Spiegel in *Synechocystis*. Dadurch kommt es zu einer Reduktion eines möglichen Transfaktors RSR (Redox Sensor Regulator), der daraufhin die Transkription des *gap2* Gens auslöst. Alternativ könnte auch ein Sigma Faktor (σ) modifiziert werden, der zusammen mit der RNA-Polymerase (RNA-Pol) die Transkription startet. Daneben wirken akzessorische Faktoren (A, B) transkriptionsaktivierend.

4.2.2. Ein konserviertes Enhancer-Motiv im *gap2* Promotor

Transkriptionelle Fusionen mit dem promotorlosen *cat*-Reportergen dienten dazu, den *gap2* Promotor eingehend in einer Deletions- und Mutationsanalyse zu untersuchen. Es konnte gezeigt werden, daß der *gap2* Minimalpromotor (P, siehe Abb. 10) durch drei positive *cis*-Elemente (A,B,C) kontrolliert wird, die zusammen die Promotoraktivität um den Faktor 100 erhöhen. Element B, das sich stromabwärts von P und damit im nicht translatierten 5'-Bereich des *gap2* Gens befindet, ist ein transkriptionelles Enhancer-Element, da es die Promotorstärke unabhängig von seiner Orientierung, Position und Distanz zu P steigert (Abb. 12). Da der *gap2* Minimalpromotor in seinem Aufbau σ^{70} -Promotoren aus *E. coli* gleicht, kann man vermuten, daß er ebenfalls mit einem σ^{70} -Faktor operiert. Ähnliche Elemente, welche die

Transkription von σ^{70} -Promotoren steigern, wurden bisher nur in den *psbA* Genen von *Synechococcus* PCC7942 beschrieben und befinden sich bemerkenswerterweise ebenfalls in der nicht translatierten 5'-Region dieser Gene (Li und Golden, 1993; Li et al., 1995). Bakterielle Enhancer-Proteine, die in der Regel an Bindestellen in σ^{54} -abhängigen Promotoren angreifen, stellen den Kontakt zur RNA-Polymerase über eine DNA-Schleife her, die häufig durch das Protein IHF stabilisiert wird (Kustu et al., 1991). Daß sich Element B in unmittelbarer Nähe des basalen Promotors befindet, spricht gegen die Bildung einer derartigen DNA-Schleife. In einer Distanz 190 bp vom Transkriptionsstart (Abb. 12, pEH4/pEH5) wäre ein entsprechender Mechanismus aber gut vorstellbar. Da auch Element C unabhängig von seiner Position die Stärke des *gap2* Promotors erhöht (Abb. 10, pB3, pB5, pT7), ist es vermutlich ebenfalls ein Enhancer-Element. Ob Element A gleichfalls als Enhancer-Element fungiert, wurde nicht getestet, kann aber nicht ausgeschlossen werden. Da eine Mutationsanalyse von Element B zwei Adenin-Nukleotide im 3'-Bereich von B als besonders wichtig auswies (siehe Abb. 13A, pTR9 im Vergleich mit pTR1/pTR2), wurde nach Konsensusmotiven dieser Region von B innerhalb der zwei anderen Elemente des *gap2* Promotors und innerhalb anderer cyanobakterieller Promotoren gesucht. Interessanterweise wurde das Motiv 5'-agaTYAACg-3' in allen drei positiven Elementen A, B und C gefunden und zudem auch in Promotoren von weiteren Genen anderer Cyanobakterien (Abb. 13B). Somit scheint es möglich, daß dieses Motiv als Bindestelle für einen Transfaktor, möglicherweise den in dieser Arbeit partiell gereinigten (siehe 3.2.5.), dient und in Prozessen wie Kohlenstoff-Metabolismus (*gap2*), Proteinsekretion (*secA*) und photosynthetischem Elektronentransport (*psbA2*) eine Rolle spielt.

4.2.3. Ein für gram-positive Bakterien typisches Promotorelement (-16 Box) in einem cyanobakteriellen Promotor

Der *gap2* Minimalpromotor wurde mittels gerichteter Mutagenese untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß das Hexamer 5'-TATgAT-3', das hinsichtlich seiner Sequenz und Position

(7 bp vom Transkriptionsstart, Abb. 17A) der Pribnow Box von σ^{70} -Promotoren in *E. coli* gleicht, dem *gap2* Promotor als -10 Box dient. Das der -35 Region ähnliche Hexamer 5'-TTGAaA-3' und auch der mit 29 bp sehr lange Spacer spielen dagegen keine Rolle für die *gap2* Transkription. Dennoch führt eine Reduktion des Spacers auf die aus *E. coli* Promotoren bekannte Länge von 17 bp zu einer deutlichen Steigerung der *gap2* Expression, die von der nun richtig lokalisierten -35 Box abhängt. In dieser Hinsicht gleicht der *gap2* Promotor dem *secA* Minimalpromotor, der als einziger anderer cyanobakterieller Promotor bisher mittels einer *in vivo* Mutationsanalyse untersucht wurde (Mazouni et al., 1998).

Besonders interessant ist, daß das Motiv 5'-TAGG-3', das sich 1 bp stromaufwärts der -10 Region befindet, nahezu ebenso wichtig für die Transkription des *gap2* Gens ist, wie die -10 Region selbst. Da dieses Motiv in Sequenz, Position und Einfluß auf die Promotorstärke einer -16 Box aus gram-positiven Bakterien gleicht (5'-TRTG-3', [Voskuil und Chambliss, 1998]), handelt es sich offenbar auch im *gap2* Promotor um eine funktionelle -16 Region. Dies ist damit die erste Beschreibung einer, aus gram-positiven Bakterien bekannten, -16 Region in Cyanobakterien. Sequenzvergleiche (Abb. 17B) weisen darauf hin, daß -16 Regionen auch in verschiedenen anderen Genen von Cyanobakterien, aber auch in Chloroplasten von Algen und Pflanzen und in Cyanophagen vorkommen (Abb. 17B). Daß diese in Chloroplasten vermutlich ebenfalls funktionell sind, zeigen Experimente an Promotoren der Photosystem II Gene aus Weizen-Chloroplasten, in denen die Deletion der Nukleotide stromaufwärts der -10 Region zu einem drastischen Abfall in der Transkriptionsrate führt (Satoh et al., 1999). Da -16 Promotoren in gram-positiven Bakterien, aber auch in *E. coli* (Voskuil et al., 1995) und Cyanobakterien (wie hier gezeigt) und möglicherweise in Cyanophagen und Chloroplasten vorkommen, kann man spekulieren, daß dieser Promotortyp schon vor der plastidären und mitochondrialen Endosymbiose eine Rolle in der transkriptionellen Regulation spielte. -16 Promotoren stellen die kürzesten Sequenzbereiche dar, die als Promotoren fungieren können, und sind deshalb möglicherweise schon relativ früh in der Evolution als basale Minimalpromotoren entstanden (Bown et al., 1997).

4.2.4. Sind Regulatoren der LysR Familie an der Kontrolle der *gap2* Expression beteiligt?

Neben Cyanobakterien und Pflanzen fixieren auch eine Reihe photosynthetischer und chemoautotropher Proteobakterien Kohlendioxid unter Verwendung des Calvin-Zyklus (Gibson und Tabita, 1996; Kusian und Bowien, 1997). In diesen Organismen findet man die Gene, die Enzyme des Calvin-Zyklus kodieren, oft in einem langen Operon, das durch einen einzigen Promotor abgelesen wird. Dieser Promotor steht meist unter der Kontrolle eines Regulators, der zur LysR Familie transkriptioneller Regulatoren gehört und mit CbbR (für Calvin-Benson Bassham-Zyklus-Regulator) bezeichnet wird. Wie in 3.3.1. beschrieben, besitzt auch *Synechocystis* zwei nahe verwandte Kopien dieses Regulatorgens (*rbcR1* und *rbcR2*) und ein weitläufig verwandtes Regulatorgen (*lysR*) der LysR Familie. Letzteres ist einem nicht charakterisierten Gen einiger plastidärer Genome (hier als YC30 bezeichnet) in seiner Aminosäuresequenz sehr ähnlich (über 70% Identität). Durch Insertionsmutagenese wurden homozygote Mutanten beider *rbcR* Gene erzeugt, das *lysR* Gen ließ sich nicht vollständig segregieren (blieb heterozygot). Da unter Standard-Wachstumsbedingungen beide *rbcR* Mutanten keinen Phänotyp zeigten und diese auch die Expression des *gap2* Gens und des rubisco Operons nicht nachhaltig beeinflussten, muß davon ausgegangen werden, daß sie in *Synechocystis* keine mit Proteobakterien vergleichbare Rolle in der Regulation des Calvin-Zyklus spielen. In letzteren agiert CbbR vermutlich als NADPH Sensor und reguliert die Transkription der Calvin-Zyklus-Gene in Abhängigkeit von der Menge an verfügbaren Redoxäquivalenten (van Keulen et al., 1998). T. Omata (Universität Nagoya, Japan) berichtete kürzlich in „Cyanomutant“ (Liste aller Mutanten in *Synechocystis*), daß RbcR1 eine Rolle in der Kohlendioxid-Assimilation von *Synechocystis* spiele. Die Rolle von RbcR2 bleibt weiterhin unklar, allerdings scheint es seine eigene Transkription zu reprimieren und damit, wie für mehrere LysR Regulatoren berichtet (Schell, 1993), einer Autoregulation zu unterliegen. Das Regulatorprotein LysR ist noch in allen Plastidengenomen vertreten, in denen *rbcS* noch nicht in den Kern transferiert wurde (Stoebe et al., 1999). Aufgrund dessen und seiner essentiellen Funktion in *Synechocystis* spielt es möglicherweise eine Rolle in der Regulation des Calvin-Zyklus.

4.3. Ausblick: Evolution von genetischen Netzwerken

Die Evolution des cyanobakteriellen Endosymbionten zum heutigen Chloroplasten ist durch massiven Gentransfer vom Genom des entstehenden Organells zum Kern der Wirtszelle gekennzeichnet (Martin et al., 1998). Auf den Transfer der Gene, die man als Module betrachten kann, folgte ihre Einbindung in ein neues Netz von Wirkungsbeziehungen. Die unterschiedliche Regulation von homologen GAPDH Genen in Cyanobakterien und Pflanzen dokumentiert beispielhaft, wie die GAPDH Module nach der Endosymbiose und erfolgtem Gentransfer in den Kern in ein neues regulatorisches Netzwerk eingebunden wurden. Im Cyanobakterium *Synechocystis* wird die Expression des *gap2* Gens durch das Redoxpotential der Zelle reguliert, einem Mechanismus, der auch heute noch für die Regulation plastidärer Gene große Bedeutung besitzt (z. B. *psbA*, [Danon und Mayfield, 1994]). In Pflanzen dagegen wird die Transkription des ursprünglich plastidären *GapA* Gens (*gap2* Homolog) über das Phytochromsystem gesteuert. Phytochrom wurde kürzlich auch in Cyanobakterien entdeckt, und aufgrund von Sequenzvergleichen ist anzunehmen, daß das pflanzliche Pendant ebenfalls cyanobakteriellen Ursprungs ist (zusammengefaßt in [Quail, 1997]). In Pflanzen kam es somit nach der Integration des *gap2* (später *GapA*) und Phytochrom-kodierenden Gens in den Kern zu einer neuartigen regulatorischen Wechselbeziehung dieser beiden Module (und natürlich weiterer), die zu der Phytochrom-abhängigen Regulation des *GapA* und auch des *GapC* Gens und damit zur Entwicklung eines neuen genetischen Netzwerks führte.

Lateraler Transfer von Genen spielt insbesondere auch für bakterielle Genome eine bedeutende Rolle. Wie durch den GAPDH Genstammbaum dokumentiert, sind Genome der Eubakterien als genetische Chimären zu verstehen, die dauerndem „Zu- und Abfluß“ von Genen unterliegen. Dies erschwert die Rekonstruktion einer bakteriellen Phylogenie und macht gleichzeitig deutlich, daß das von Darwin geforderte und lange Zeit akzeptierte Bild der hierarchischen Evolution auf der Ebene der Gene nur sehr begrenzte Gültigkeit besitzt. Der Fluß von genetischer Information in Form von Modulen zwischen den verschiedensten Taxa verdeutlicht, daß wir es hier mit einem äußerst komplexen Wirkungsgefüge zu tun haben. Es existiert damit nicht nur innerhalb jedes Organismus, sondern zumindest ansatzweise Organismen-übergreifend, ein viel größeres genetisches Netzwerk, das durch die Neukombination von Mo-

dulen wie GAPDH die Evolution von komplexen Lebewesen und nicht zuletzt uns selbst ermöglichte.

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden zwei thematisch verwandte Themengebiete behandelt:

1. Die Phylogenie und Diversität von GAPDH Genen in Eubakterien und Eukaryoten wurde mit dem Schwerpunkt cyanobakterieller und spirochaetaler Sequenzen eingehend untersucht.

Hierzu wurden aus den Cyanobakterien *Prochloron didemni* (*gap2* und *gap3*), *Prochlorococcus marinus* (*gap2*) und *Gloeobacter violaceus* (*gap1* und *gap2*) *gap* Gene per PCR amplifiziert, kloniert und sequenziert. Phylogenetische Analysen bestätigen, daß die Präsenz von Chlorophyll b in den Prochlorophyten (*Prochloron*, *Prochlorococcus*) kein phylogenetisch relevantes Merkmal darstellt und daß diese Organismen nicht näher mit Pflanzen verwandt sind als andere Cyanobakterien. Die aufgrund morphologischer Charakteristika getroffene Annahme, daß *Gloeobacter* das ursprünglichste Cyanobakterium ist, wurde nur durch Analysen der *gap2* Gene bestätigt. Möglicherweise ist *Gloeobacter* nur ein sehr stark abgeleitetes Cyanobakterium und frühere Analysen unterliegen einem phylogenetischen Rekonstruktionsartefakt, das als „Long Branch Artifact“ (LBA) bekannt ist. Daß die Position von *Euglena* im Gap-II Baum eindeutig auf einem derartigen Artefakt beruht, konnte durch schrittweise Verringerung der Außengruppe bewiesen werden.

Basierend auf phylogenetischen Analysen wurde in dieser Arbeit eine nahe Verwandtschaft zwischen der Gap1 Sequenz aus der Spirochaete *Treponema pallidum* und den GapC Sequenzen der Euglenozoa (*Trypanosoma*, *Euglena*) entdeckt. Ausgehend von diesem Befund wurden *gap* Gene aus insgesamt neun Spirochaeten-Spezies kloniert und sequenziert. Die phylogenetische Analyse dieser Sequenzen zusammen mit allen derzeit verfügbaren eubakteriellen GAPDH Sequenzen und einer Auswahl an eukaryotischen Sequenzen ergab ein unerwartetes Bild. Nur insgesamt vier spirochaetale Gap Sequenzen befinden sich, wie erwartet, zusammen mit den GapC Sequenzen der Euglenozoa an einem gemeinsamen Ast. Alle anderen acht spirochaetalen Gap Sequenzen sind über die eubakterielle GAPDH Phylogenie verstreut. Diese selbst weist mindestens fünf Gruppen deutlich voneinander getrennter GAPDH Typen auf, die von weiteren weniger distinkten Gruppierungen eingerahmt werden. Die heute beobachtete Diversität ist vermutlich das Ergebnis ursprünglicher, schon im gemeinsamen Vorfahren der Eubakterien vorhandener, Gendiversität und nachfolgender Durchmischung von Genen durch lateralen Gentransfer.

2. Die Regulation der beiden GAPDH kodierenden Gene *gap1* und *gap2* des Cyanobakteriums *Synechocystis* PCC6803 wurde über Northern Analysen untersucht. Beide Gene werden monocistronisch und in Abhängigkeit des Redoxpotentials der Zelle transkribiert. Im Fall von *gap2* konnte durch Inhibitorstudien gezeigt werden, daß dieser redoxabhängige Mechanismus von einer funktionierenden Elektronenübertragung von Photosystem I zu den nachfolgenden Redoxcarriern abhängt. Über „primer extension“ und „nuclease protection assays“ wurde der Transkriptionsstartpunkt des *gap2* Gens ermittelt. In einer Deletionsreihe des *gap2* Promotors, die auf transkriptionellen Fusionen mit dem CAT-Reportergen basierte, konnte der Minimalpromotor des *gap2* Gens und drei regulatorische Regionen identifiziert werden. Diese steigern zusammen die Stärke des Minimalpromotors um den Faktor 100. Es wurde nachgewiesen, daß eines dieser Elemente, das sich in der nicht translatierten 5'-Region befindet, ein Enhancer-Element ist, da es die *gap2* Promotoraktivität unabhängig von seiner Orientierung und Position zu stimulieren vermag. Ein Transfaktor, der vermutlich diese Steigerung hervorruft, wurde über Heparin-Sepharose Chromatographie angereichert und über Gelretardationsanalysen identifiziert. Die Mutationsanalyse des Enhancer-Elements zeigte, daß der 3'-Bereich dieses Elements eine besondere Rolle für seine transkriptionssteigernde Wirkung besitzt. Basierend auf Sequenzvergleichen konnte ein Motiv identifiziert werden, das auch in den beiden anderen transkriptionsaktivierenden Regionen des *gap2* Promotors und einigen anderen cyanobakteriellen Promotoren konserviert ist und auch dort möglicherweise eine Rolle in der transkriptionellen Regulation spielt.

Die Mutationsanalyse des *gap2* Minimalpromotors führte zur Identifikation einer -16 Promotor Box, die bisher noch nicht in Cyanobakterien beschrieben wurde, sondern typisch für Promotoren gram-positiver Bakterien ist. Sequenzalignments mit Promotoren von anderen Cyanobakterien und von Chloroplasten aus Grünalgen und Landpflanzen weisen darauf hin, daß -16 Regionen in diesen Organismen offensichtlich ebenfalls eine wichtige Bedeutung haben.

6. Literaturverzeichnis

- Akhmanova, A., Voncken, F., van Alen, T., van Hoek, A., Boxma, B., Vogels, G., Veenhuis, M., and Hackstein, J. H. (1998). A hydrogenosome with a genome. *Nature* **396**: 527-8.
- Andersson, S. G., and Kurland, C. G. (1998). Reductive evolution of resident genomes. *Trends Microbiol* **6**: 263-8.
- Andersson, S. G., Zomorodipour, A., Andersson et al. (10 Koautoren). (1998). The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature* **396**: 133-40.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seldman, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K. (1987). Current protocols in molecular biology, Greene/ Wiley-Interscience, New York.
- Bermudes, D., Hinkle, G., Margulis, L. (1994). Do prokaryotes contain microtubules? *Microbiol Rev* **58**: 387-400.
- Bhattacharya, D., and Medlin, L. (1995). The phylogeny of plastids: A review based on comparisons of small-subunit ribosomal RNA coding regions. *J. Phycol.* **31**: 489-98.
- Bi, E. F., Lutkenhaus, J. (1991). FtsZ ring structure associated with division in *Escherichia coli*. *Nature* **14**: 161-4
- Blattner, F. R., Plunkett, G. r., Bloch et al. (17 Koautoren). (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**: 1453-74.
- Bown, J. A., Barne, K. A., Minchin, S. D., and Busby, S. J. W. (1997). Extended -10 Promoters. In: Nucleic Acids and Molecular Biology, F. Eckstein and D. M. J. Lilley (eds.), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 41-52.
- Boyer, H. W., and Roulland-Dussoix, D. (1969). A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **41**: 459-72.

- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-54.
- Brinkmann, H., Cerff, R., Salomon, M., and Soll, J. (1989). Cloning and sequence analysis of cDNAs encoding the cytosolic precursors of subunits GapA and GapB of chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from pea and spinach. *Plant Mol Biol* **13**: 81-94.
- Brinkmann, H., and Martin, W. (1996). Higher-plant chloroplast and cytosolic 3-phosphoglycerate kinases: a case of endosymbiotic gene replacement. *Plant Mol Biol* **30**: 65-75.
- Brinkmann, H., and Philippe, H. (1999). Archaea sister group of Bacteria? Indications from tree reconstruction artifacts in ancient phylogenies. *Mol Biol Evol* **16**: 817-25.
- Brown, J. R., and Doolittle, W. F. (1997). Archaea and the prokaryote-to-eukaryote transition. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**: 456-502.
- Bui, E. T., Bradley, P. J., and Johnson, P. J. (1996). A common evolutionary origin for mitochondria and hydrogenosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 9651-6.
- Bullock, W. O., Fernandez, J. M., and Short, J. M. (1987). XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques* **5**: 376.
- Campbell, D., Houmard, J., and Tandeau De Marsac, N. (1993). Electron transport regulates cellular differentiation in the filamentous cyanobacterium *Calothrix*. *Plant Cell* **5**: 451-63.
- Canale-Parola, E. (1977). Physiology and evolution of spirochetes. *Bacteriol Rev* **41**: 181-204.
- Casjens, S., Delange, M., Ley, H. L. 3rd, Rosa, P., and Huang, W. M. (1995). Linear chromosomes of Lyme disease agent spirochetes: genetic diversity and conservation of gene order. *J Bacteriol* **177**: 2769-80.

- Cavalier-Smith, T. (1987). Eukaryotes with no mitochondria. *Nature* **326**: 332-3.
- Cerff, R. (1995). The chimeric nature of nuclear genomes and the antiquity of introns as demonstrated by the GAPDH gene system. In: Tracing Biological Evolution in Protein and Gene Structures, M. Gö , P. Schimmel (eds), Elsevier, Amsterdam, pp. 205-27.
- Cerff, R. (1978). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NADP) from *Sinapis alba*: steady state kinetics. *Phytochemistry* **17**: 2061-67.
- Chauvat, F., De Vries, L., Van der Ende, A., and Van Arkel, G. A. (1986). A host-vector system for gene cloning in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Mol Gen Genet* **204**: 185-91.
- Clark, C. G., and Roger, A. J. (1995). Direct evidence for secondary loss of mitochondria in *Entamoeba histolytica*. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 6518-21.
- Clermont, S., Corbier, C., Mely, Y., Gerard, D., Wonacott, A., and Branlant, G. (1993). Determinants of coenzyme specificity in glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: role of the acidic residue in the fingerprint region of the nucleotide binding fold. *Biochemistry* **32**: 10178-84.
- Conley, T. R., and Shih, M. C. (1995). Effects of light and chloroplast functional state on expression of nuclear genes encoding chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in long hypocotyl (*hy*) mutants and wild-type *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **108**: 1013-22.
- Cozens, A. L., and Walker, J. E. (1987). The organization and sequence of the genes for ATP synthase subunits in the cyanobacterium *Synechococcus* 6301: Support for an endosymbiotic origin of chloroplasts. *J Mol Biol* **194**: 359-83.
- Curtis, S. E., and Martin, J. A. (1994). The transcription apparatus and the regulation of transcription initiation. In: The Molecular Biology of Cyanobacteria, D. A. Bryant (ed), Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp. 613-39.

Danon, A., and Mayfield, S. P. (1994). Light-regulated translation of chloroplast messenger RNAs through redox potential. *Science* **266**: 1717-9.

Darwin, C. (1859). On the origin of species by means of natural selection.

Delwiche, C. F., and Palmer, J. D. (1997). The origin of plastids and their spread via secondary endosymbiosis. In: Origins of algae and their plastids, Bhattacharya (ed), Springer Verlag, Wien, pp. 53-86.

Dewdney, J., Conley, T. R., Shih, M. C., and Goodman, H. M. (1993). Effects of blue and red light on expression of nuclear genes encoding chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **103**: 1115-21.

Doolittle, R. F. (1998). The case for gene transfer between very distantly related organisms. In: Horizontal Gene Transfer, K. Syvanen and C. I. Kado (eds), Chapman & Hall, London, pp. 311-20.

Doolittle, W. F. (1978). Gene-in-pieces, were they ever together? *Nature* **272**: 581-2.

Doolittle, W. F. (1999). Phylogenetic classification and the universal tree. *Science* **284**: 2124-9.

Doolittle, W. F. (1998). You are what you eat: a gene transfer ratchet could account for bacterial genes in eukaryotic nuclear genomes. *TIGS* **14**: 307-11.

Douglas, S. E. (1994). Chloroplast Origins and Evolution. In: The Molecular Biology of Cyanobacteria, D. A. Bryant (ed), Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp. 91-118.

Eisen, J. A. (1995). The RecA protein as a model molecule for molecular systematic studies of bacteria: comparison of trees of RecAs and 16S rRNAs from the same species. *J Mol Evol* **41**: 1105-23.

Fankhauser, C., and Chory, J. (1997). Light control of plant development. *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**: 203-29.

Felsenstein, J. (1978). Cases in which parsimony or compatibility methods will be positively misleading. *Syst Zool* **27**: 401-10.

Felsenstein, J. (1989). PHYLIP: phylogeny interference package (version 3.2). *Cladistics* **5**: 164-5.

Ferino, F., and Chauvat, F. (1989). A promoter-probe vector-host system for the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803. *Gene* **84**: 257-66.

Forthergill-Gilmore, L. A., and Michels, P. A. M. (1993). Evolution of glycolysis. *Prog. Biophys. Molec. Biol.* **59**: 105-235.

Fox, G. E., Stackebrandt, E., Hespell et al. (19 Koautoren). (1980). The phylogeny of prokaryotes. *Science* **209**: 457-63.

Fraser, C. M., Casjens, S., Huang et al. (38 Koautoren) (1997). Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature* **390**: 580-6.

Fraser, C. M., Norris, S. J., Weinstock et al. (33 Koautoren) (1998). Complete genome sequence of *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete. *Science* **281**: 375-88.

Garcia-Dominguez, M., and Florencio, F. J. (1997). Nitrogen availability and electron transport control the expression of *glnB* gene (encoding PII protein) in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Mol Biol* **35**: 723-34.

Germot, A., Philippe, H., and Le Guyader, H. (1996). Presence of a mitochondrial-type 70-kDa heat shock protein in *Trichomonas vaginalis* suggests a very early mitochondrial endosymbiosis in eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 14614-7.

- Gibbs, S. H. (1978). The chloroplast of *Euglena* may have evolved from symbiotic green algae. *Can. J. Bot.* **56**: 2883-9.
- Gibson, J. L., and Tabita, F. R. (1996). The molecular regulation of the reductive pentose phosphate pathway in Proteobacteria and Cyanobacteria. *Arch Microbiol* **166**: 141-50.
- Gogarten, J. P., Kibak, H., Dittrich, P., et al. (13 Koautoren). (1989). Evolution of the vacuolar H⁺-ATPase: implications for the origin of eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 6661-5.
- Golden, S. S. (1995). Light-responsive gene expression in cyanobacteria. *J Bacteriol* **177**: 1651-4.
- Gralla, J. D., and Collado-Vides, J. (1996). Organization and function of transcriptional regulatory elements. In: *Escherichia coli* and *Salmonella*, F. C. Neidhardt, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter and H. E. Umbarger, (eds), ASM Press, Washington DC, pp. 1232-45.
- Gray, M. W. (1992). The endosymbiont hypothesis revisited. *Int Rev Cytol* **141**: 233-357.
- Gray, M. W., Burger, G., and Lang, B. F. (1999). Mitochondrial evolution. *Science* **283**: 1476-81.
- Gray, M. W., and Doolittle, W. F. (1982). Has the endosymbiont hypothesis been proven? *Microbiol Rev* **46**: 1-42.
- Gray, M. W., and Spencer, D. F. (1996). Organellar evolution. In *Evolution of microbial life*, D. M. Roberts, P. Sharp, G. Alderson and M. Collins (eds), Cambridge Univ. Press, Cambridge, pp. 107-26.
- Green, R., and Noller, H. F. (1997). Ribosomes and translation. *Annu Rev Biochem* **66**: 679-716.

- Grossman, A. R., Schaefer, M. R., Chiang, G. G., and Collier, J. L. (1993). The phycobilisome, a light-harvesting complex responsive to environmental conditions. *Microbiol Rev* **57**: 725-49.
- Guglielmi, G., Cohen-Bazire, G., and Bryant, D. A. (1981). The structure of *Gloeobacter violaceus* and its phycobilisomes. *Arch. Microbiol.* **129**: 181-9.
- Hannaert, V., Blaauw, M., Kohl, L., Allert, S., Opperdoes, F. R., and Michels, P. A. (1992). Molecular analysis of the cytosolic and glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in *Leishmania mexicana*. *Mol Biochem Parasitol* **55**: 115-26.
- Harley, C. B., and Reynolds, R. P. (1987). Analysis of *E. coli* promoter sequences. *Nucleic Acids Res* **15**: 2343-61.
- Harwood, C. S., and Canale-Parola, E. (1984). Ecology of spirochetes. *Ann. Rev. Microbiol.* **38**: 161-92.
- Hashimoto, T., Sanchez, L. B., Shirakura, T., Müller, M., and Hasegawa, M. (1998). Secondary absence of mitochondria in *Giardia lamblia* and *Trichomonas vaginalis* revealed by valyl-tRNA synthetase phylogeny. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 6860-5.
- Hensel, R., Zwickl, P., Fabry, S., Lang, J., and Palm, P. (1989). Sequence comparison of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases from the three kingdoms: evolutionary implication. *Can J Microbiol* **35**: 81-5.
- Henze, K., Badr, A., Wettern, M., Cerff, R., and Martin, W. (1995). A nuclear gene of eubacterial origin in *Euglena gracilis* reflects cryptic endosymbioses during protist evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 9122-6.
- Hess, W. R., Partensky, F., van der Staay, G. W., Garcia-Fernandez, J. M., Börner, T., and Vaultot, D. (1996). Coexistence of phycoerythrin and a chlorophyll a/b antenna in a marine prokaryote. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 11126-30.

Hirt, R. P., Healy, B., Vossbrinck, C. R., Canning, E. U., and Embley, T. M. (1997). A mitochondrial Hsp70 orthologue in *Vairimorpha necatrix*: molecular evidence that microsporidia once contained mitochondria. *Curr Biol* **7**: 995-8.

Holt, S. C. (1978). Anatomy and chemistry of spirochetes. *Microbiol Rev* **42**: 114-60.

Huang, Y. P., and Ito, J. (1999). DNA polymerase C of the thermophilic bacterium *Thermus aquaticus*: classification and phylogenetic analysis of the family C DNA polymerases. *J Mol Evol* **48**: 756-69.

Ishikura, K., Takaoka, Y., Kato, K., Sekine, M., Yoshida, K., and Shinmyo, A. (1999). Expression of a foreign gene in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. *J. Biosci. Bioeng.* **87**: 307-14.

Iwabe, N., Kuma, K., Hasegawa, M., Osawa, S., and Miyata, T. (1989). Evolutionary relationship of archaeobacteria, eubacteria, and eukaryotes inferred from phylogenetic trees of duplicated genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 9355-9.

Jain, R., Rivera, M. C., and Lake, J. A. (1999). Horizontal gene transfer among genomes: the complexity hypothesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 3801-6.

John, P., and Whatley, F. R. (1975). *Paracoccus denitrificans* and the evolutionary origin of mitochondria. *Nature* **254**: 495-8.

Kaneko, T., Sato, S., Kotani et al. (24 Koautoren) (1996). Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Res* **3**: 109-36.

Keeling, P. J. (1998). A kingdom's progress: Archezoa and the origin of eukaryotes. *BioEssays* **20**: 87-95.

Kehoe, D. M., and Grossman, A. R. (1996). Similarity of a chromatic adaptation sensor to phytochrome and ethylene receptors. *Science* **273**: 1409-12.

Keilty, S., and Rosenberg, M. (1987). Constitutive function of a positively regulated promoter reveals new sequences essential for activity. *J Biol Chem* **262**: 6389-95.

Kersanach, R., Brinkmann, H., Liaud, M. F., Zhang, D. X., Martin, W., and Cerff, R. (1994). Five identical intron positions in ancient duplicated genes of eubacterial origin. *Nature* **367**: 387-9.

Kiley, P. J., and Beinert, H. (1998). Oxygen sensing by the global regulator, FNR: the role of the iron-sulfur cluster. *FEMS Microbiol Rev* **22**: 341-52.

Kis, M., Zsiros, O., Farkas, T., Wada, H., Nagy, F., and Gombos, Z. (1998). Light-induced expression of fatty acid desaturase genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 4209-14.

Kohler, S., Delwiche, C. F., Denny, P. W., Tilney, L. G., Webster, P., Wilson, R. J., Palmer, J. D., and Roos, D. S. (1997). A plastid of probable green algal origin in Apicomplexan parasites. *Science* **275**: 1485-9.

Köhler, U., Liaud, M. F., Mendel, R. R., Cerff, R., and Hehl, R. (1995). The maize GapC4 promoter confers anaerobic reporter gene expression and shows homology to the maize anthocyanin regulatory locus C1. *Plant Mol Biol* **29**: 1293-8.

Koksharova, O., Schubert, M., Shestakov, S., and Cerff, R. (1998). Genetic and biochemical evidence for distinct key functions of two highly divergent GAPDH genes in catabolic and anabolic carbon flow of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Mol Biol* **36**: 183-94.

Kumar, A., Malloch, R. A., Fujita, N., Smillie, D. A., Ishihama, A., and Hayward, R. S. (1993). The minus 35-recognition region of *Escherichia coli* sigma 70 is inessential for initiation of transcription at an "extended minus 10" promoter. *J Mol Biol* **232**: 406-18.

Kusian, B., and Bowien, B. (1997). Organization and regulation of *cbb* CO₂ assimilation genes in autotrophic bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **21**: 135-55.

- Kustu, S., North, A. K., and Weiss, D. S. (1991). Prokaryotic transcriptional enhancers and enhancer-binding proteins. *Trends Biochem Sci* **16**: 397-402.
- Lang, B. F., Burger, G., O'Kelly, C. J., Cedergren, R., Golding, G. B., Lemieux, C., Sankoff, D., Turmel, M., and Gray, M. W. (1997). An ancestral mitochondrial DNA resembling a eubacterial genome in miniature. *Nature* **387**: 493-7.
- Lang, J. D., and Haselkorn, R. (1989). Isolation, sequence and transcription of the gene encoding the photosystem II chlorophyll-binding protein, CP-47, in the cyanobacterium *Anabaena* 7120. *Plant Mol Biol* **13**: 441-57.
- Lawrence, J. G., and Ochman, H. (1998). Molecular archaeology of the *Escherichia coli* genome. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 9413-7.
- Lewin, R. A., and Withers, N. W. (1975). Extraordinary pigment composition of a prokaryotic alga. *Nature* **256**: 735-7.
- Li, R., Dickerson, N. S., Mueller, U. W., and Golden, S. S. (1995). Specific binding of *Synechococcus* sp. strain PCC 7942 proteins to the enhancer element of *psbAII* required for high-light-induced expression. *J Bacteriol* **177**: 508-16.
- Li, R., and Golden, S. S. (1993). Enhancer activity of light-responsive regulatory elements in the untranslated leader regions of cyanobacterial *psbA* genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 11678-82.
- Li, W.-H. (1997). Evolution by gene duplication and domain shuffling. In: Molecular evolution, Sinauer Associates, Inc., Publishers, Sunderland, MA, pp. 269-308.
- Li, W.-H. (1997). Roles of mutation and selection in molecular evolution. In: Molecular evolution, Sinauer Associates, Inc., Publishers, Sunderland, MA, pp. 428-32.

- Liaud, M. F., Brandt, U., Scherzinger, M., and Cerff, R. (1997). Evolutionary origin of cryptomonad microalgae: two novel chloroplast/cytosol-specific GAPDH genes as potential markers of ancestral endosymbiont and host cell components. *J Mol Evol* 44 Suppl 1: S28-37.
- Liaud, M. F., Valentin, C., Martin, W., Bouget, F. Y., Kloareg, B., and Cerff, R. (1994). The evolutionary origin of red algae as deduced from the nuclear genes encoding cytosolic and chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases from *Chondrus crispus*. *J Mol Evol* 38: 319-27.
- Liaud, M. F., Zhang, D. X., and Cerff, R. (1990). Differential intron loss and endosymbiotic transfer of chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 8918-22.
- Lill, H., and Nelson, N. (1991). The *atp1* and *atp2* operons of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Mol Biol* 17: 641-52.
- Loiseaux, S., Mache, R., and Rozier, C. (1975). Rifampicin inhibition of the plastid rRNA synthesis of *Marchantia polymorpha*. *J Cell Sci* 17: 327-35.
- Loiseaux-de Goer, S. (1994). Plastid lineages. In: Progress in phycological research, F. E. Round and D. J. Chapman (eds), Biopress, Ltd, Bristol, U.K, pp. 138-77.
- MacDougall, J., and Saint Girons, I. (1995). Physical map of the *Treponema denticola* circular chromosome. *J Bacteriol* 177: 1805-11.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., and Parker, J. (1997). Biology of microorganisms, P. F. Corey (ed), Prentice-Hall, Inc, Upper Saddle River (NJ).
- Margulis, L. (1970). Origin of eukaryotic cells, Yale University Press, New Haven, Connecticut.
- Margulis, L. Leleng, T. Chase, D. (1978). Microtubules in prokaryotes. *Science* 200: 1118-24.

- Marraccini, P., Bulteau, S., Cassier-Chauvat, C., Mermet-Bouvier, P., and Chauvat, F. (1993). A conjugative plasmid vector for promoter analysis in several cyanobacteria of the genera *Synechococcus* and *Synechocystis*. *Plant Mol Biol* **23**: 905-9.
- Marraccini, P., Cassier-Chauvat, C., Bulteau, S., Chavez, S., and Chauvat, F. (1994). Light-regulated promoters from *Synechocystis* PCC6803 share a consensus motif involved in photoregulation. *Mol Microbiol* **12**: 1005-12.
- Martin, W. (1999). Mosaic bacterial chromosomes: a challenge en route to a tree of genomes. *Bioessays* **21**: 99-104.
- Martin, W., Brinkmann, H., Savonna, C., and Cerff, R. (1993). Evidence for a chimeric nature of nuclear genomes: eubacterial origin of eukaryotic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 8692-6.
- Martin, W., and Müller, M. (1998). The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. *Nature* **392**: 37-41.
- Martin, W., Nock, S., Meyer-Gauen, G., Hager, K. P., Jensen, U., and Cerff, R. (1993). A method for isolation of cDNA-quality mRNA from immature seeds of a gymnosperm rich in polyphenolics. *Plant Mol Biol* **22**: 555-6.
- Martin, W., and Schnarrenberger, C. (1997). The evolution of the Calvin cycle from prokaryotic to eukaryotic chromosomes: a case study of functional redundancy in ancient pathways through endosymbiosis. *Curr Genet* **32**: 1-18.
- Martin, W., Sommerville, C. C., and Loiseaux-de Goër, S. (1992). Molecular Phylogenies of Plastid Origins and Algal Evolution. *J Mol Evol* **35**: 385-404.
- Martin, W., Stöbe, B., Goremykin, V., Hansmann, M., Hasegawa, M., and Kowallik, K. V. (1998). Gene transfer to the nucleus and the evolution of chloroplasts. *Nature* **393**: 162-5.

Matthijs, H. C. P., van der Stay, G. W. M., and Mur, L. R. (1994). Prochlorophytes: The "Other" Cyanobacteria. In: *The Molecular Biology of Cyanobacteria*, D. A. Bryant (ed), Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp. 49-64.

Mazel, D., Dychinco, B., Webb, V. A., and Davies, J. (1998). A distinctive class of integron in the *Vibrio cholerae* genome. *Science* **280**: 605-8.

Mazouni, K., Bulteau, S., Cassier-Chauvat, C., and Chauvat, F. (1998). Promoter element spacing controls basal expression and light inducibility of the cyanobacterial *secA* gene. *Mol Microbiol* **30**: 1113-22.

Mereschkowsky, C. (1905). Über Natur und Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreiche. *Biologisches Zentralblatt* **25**: 593-604.

Mermet-Bouvier, P., and Chauvat, F. (1994). A conditional expression vector for the cyanobacteria *Synechocystis* sp. strains PCC6803 and PCC6714 or *Synechococcus* sp. strains PCC7942 and PCC6301. *Curr Microbiol* **28**: 145-8.

Michels, P. A., Marchand, M., Kohl, L., Allert, S., Wierenga, R. K., and Opperdoes, F. R. (1991). The cytosolic and glycosomal isoenzymes of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in *Trypanosoma brucei* have a distant evolutionary relationship. *Eur J Biochem* **198**: 421-8.

Michels, P. A. M., Hannaert, V., and Bakker, B. M. (1997). Glycolysis of Kinetoplastida. In: *Trypanosomiasis and Leishmaniasis*, G. Hide, J. C. Mottram, G. H. Coombs and P. H. Holmes (eds), Cab International, pp. 133-48.

Miller, S. S., Ausubel, F. M., and Bogorad, L. (1979). Cyanobacterial ribonucleic acid polymerases recognize lambda promoters. *J Bacteriol* **140**: 246-50.

Misset, O., Van Beeumen, J., Lambeir, A. M., Van der Meer, R., and Opperdoes, F. R. (1987). Glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma brucei*. Comparison of the glycosomal and cytosolic isoenzymes. *Eur J Biochem* **162**: 501-7.

- Mohamed, A., and Jansson, C. (1989). Influence of light on accumulation of photosynthesis-specific transcripts in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *Plant Mol Biol* **13**: 693-700.
- Mohamed, A., and Jansson, C. (1991). Photosynthetic electron transport controls degradation but not production of *psbA* transcripts in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *Plant Mol Biol* **16**: 891-7.
- Moran, C. P., Jr., Lang, N., LeGrice, S. F., Lee, G., Stephens, M., Sonenshein, A. L., Pero, J., and Losick, R. (1982). Nucleotide sequences that signal the initiation of transcription and translation in *Bacillus subtilis*. *Mol Gen Genet* **186**: 339-46.
- Morden, C. W., Delwiche, C. F., Kuhsel, M., and Palmer, J. D. (1992). Gene phylogenies and the endosymbiotic origin of plastids. *Biosystems* **28**: 75-90.
- Morden, C. W., and Golden, S. S. (1989). *psbA* genes indicate common ancestry of prochlorophytes and chloroplasts. *Nature* **337**: 382-5.
- Müller, M. (1993). The hydrogenosome. *J Gen Microbiol* **139**: 2879-89.
- Nelissen, B., Van de Peer, Y., Wilmotte, A., and De Wachter, R. (1995). An early origin of plastids within the cyanobacterial divergence is suggested by evolutionary trees based on complete 16S rRNA sequences. *Mol Biol Evol* **12**: 1166-73.
- Palenik, B., and Haselkorn, R. (1992). Multiple evolutionary origins of prochlorophytes, the chlorophyll b-containing prokaryotes. *Nature* **355**: 265-7.
- Pancholi, V., and Fischetti, V. A. (1993). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase on the surface of group A streptococci is also an ADP-ribosylating enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 8154-8.
- Paster, B. J., Dewhirst, F. E., Olsen, I., and Fraser, G. J. (1994). Phylogeny of *Bacteroides*, *Prevotella*, and *Porphyromonas* spp. and related bacteria. *J Bacteriol* **176**: 725-32.

Paster, B. J., Dewhirst, F. E., Weisburg et al. (10 Koautoren) (1991). Phylogenetic analysis of the spirochetes. *J Bacteriol* **173**: 6101-9.

Petersen, J. (1999). Duplikationen und lateraler Transfer von Genen als Motor der Evolution: Molekulare Studien am GAPDH-System von Grünalgen, Landpflanzen und Chlorarachniophyta. Dissertation, Technische Universität Braunschweig.

Pfannschmidt, T., Nilsson, A., and Allen, J. F. (1999). Photosynthetic control of chloroplast gene expression. *Nature* **397**: 625-8.

Powell, B., Mergeay, M., and Christofi, N. (1989). Transfer of broad host-range plasmids to sulphate-reducing bacteria. *FEMS Microbiol Lett* **59**: 269-274.

Prüß, B., Meyer, H. E., and Holldorf, A. W. (1993). Characterization of the glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from the extremely halophilic archaebacterium *Haloarcula vallismortis*. *Arch Microbiol* **160**: 5-11.

Quail, P. H. (1997). The phytochromes: a biochemical mechanism of signaling in sight? *Bioessays* **19**: 571-9.

Rainey, F. A., Nobre, M. F., Schumann, P., Stackebrandt, E., and da Costa, M. S. (1997). Phylogenetic diversity of the deinococci as determined by 16S ribosomal DNA sequence comparison. *Int J Syst Bacteriol* **47**: 510-4.

Reyes, J. C., and Florencio, F. J. (1995). Electron transport controls transcription of the glutamine synthetase gene (*glnA*) from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Mol Biol* **27**: 789-99.

Rhiel, E., Stirewalt, V. L., Gasparich, G. E., and Bryant, D. A. (1992). The *psaC* genes of *Synechococcus* sp. PCC7002 and *Cyanophora paradoxa*: cloning and sequence analysis. *Gene* **112**: 123-8.

- Rippka, R., and Herdmann, M. (1992). Pasteur Culture Collection of cyanobacterial strains in axenic culture, Catalogue of strains, Institut Pasteur, Paris, France, p. 103.
- Rippka, R., Waterbury, J. B., and Cohen-Bazire, G. (1974). A cyanobacterium which lacks thylakoids. *Arch Microbiol* **100**: 419-36.
- Rivera, M. C., Jain, R., Moore, J. E., and Lake, J. A. (1998). Genomic evidence for two functionally distinct gene classes. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 6239-44.
- Roger, A. J., Svard, S. G., Tovar, J., Clark, C. G., Smith, M. W., Gillin, F. D., and Sogin, M. L. (1998). A mitochondrial-like chaperonin 60 gene in *Giardia lamblia*: evidence that diplomonads once harbored an endosymbiont related to the progenitor of mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 229-34.
- Saitou, N., and Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**: 406-25.
- Sambrook, J., Fritsch, F. E., and Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Satoh, J., Baba, K., Nakahira, Y., Tsunoyama, Y., Shiina, T., and Toyoshima, Y. (1999). Developmental stage-specific multi-subunit plastid RNA polymerases (PEP) in wheat. *Plant J* **18**: 407-15.
- Schell, M. A. (1993). Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. *Annu Rev Microbiol* **47**: 597-626.
- Schlegel, H. G. (1985). Allgemeine Mikrobiologie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York.
- Schluchter, W. M., Zhao, J., and Bryant, D. A. (1993). Isolation and characterization of the *ndhF* gene of *Synechococcus* sp. strain PCC 7002 and initial characterization of an interposon mutant. *J Bacteriol* **175**: 3343-52.

Schneider, G. J., and Haselkorn, R. (1988). Characterization of two early promoters of cyanophage N-1. *Virology* **167**: 150-5.

Schneider, G. J., Lang, J. D., and Haselkorn, R. (1991). Promoter recognition by the RNA polymerase from vegetative cells of the cyanobacterium *Anabaena* 7120. *Gene* **105**: 51-60.

Schneider, G. J., Tumer, N. E., Richaud, C., Borbely, G., and Haselkorn, R. (1987). Purification and characterization of RNA polymerase from the cyanobacterium *Anabaena* 7120. *J Biol Chem* **262**: 14633-9.

Schubert, M. (1997). Divergente Evolutionswege bakterieller GAPDH-Gene als Triebkraft zur Entstehung neuer Proteinfunktionen, Dissertation, TU-Braunschweig.

Schyns, G., Jia, L., Coursin, T., Tandeau de Marsac, N., and Houmard, J. (1998). Promoter recognition by a cyanobacterial RNA polymerase: in vitro studies with the *Calothrix* sp. PCC 7601 transcriptional factors RcaA and RcaD. *Plant Mol Biol* **36**: 649-59.

Selstam, E., and Campbell, D. (1996). Membrane lipid composition of the unusual cyanobacterium *Gloeobacter violaceus* sp. PCC 7421, which lacks sulfoquinovosyl diacylglycerol. *Arch Microbiol* **166**: 132-5.

Sirover, M. A. (1999). New insights into an old protein: the functional diversity of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta* **1432**: 159-84.

Smith, T. L. (1989). Disparate evolution of yeasts and filamentous fungi indicated by phylogenetic analysis of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 7063-6.

Stanier, R. Y. (1970). Some aspects of the biology of cells and their possible evolutionary significance. In: Organization and control in prokaryotic and eukaryotic cells, H. P. Charles and C. J. G. Knight (eds), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 1-38.

- Stoebe, B., Hansmann, S., Goremykin, V., Kowallik, K. V., and Martin, W. (1999). An overview of gene content, phylogenetic information, and endosymbiotic gene transfer to the nucleus. In: *Advances in Plant Molecular Systematics*, C. Hollingsworth, R. Batemann and M. Gornall (eds), Francis and Taylor, Andover, pp. 327-52.
- Tandeau de Marsac, N., and Houmard, J. (1993). Adaptation of cyanobacteria to environmental stimuli: new steps towards molecular mechanisms. *FEMS Microbiol Rev* **104**: 119-90.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**: 4673-80.
- Tomitani, A., Okada, K., Miyashita, H., Matthijs, H. C., Ohno, T., and Tanaka, A. (1999). Chlorophyll b and phycobilins in the common ancestor of cyanobacteria. *Nature* **400**: 159-62.
- Urbach, E., Robertson, D. L., and Chisholm, S. W. (1992). Multiple evolutionary origins of prochlorophytes within the cyanobacterial radiation. *Nature* **355**: 267-70.
- van Keulen, G., Girbal, L., van den Bergh, E. R., Dijkhuizen, L., and Meijer, W. G. (1998). The LysR-type transcriptional regulator CbbR controlling autotrophic CO₂ fixation by *Xanthobacter flavus* is an NADPH sensor. *J Bacteriol* **180**: 1411-7.
- van Thor, J. J., Hellingwerf, K. J., and Matthijs, H. C. (1998). Characterization and transcriptional regulation of the *Synechocystis* PCC 6803 *petH* gene, encoding ferredoxin-NADP⁺ oxidoreductase: involvement of a novel type of divergent operator. *Plant Mol Biol* **36**: 353-63.
- Viale, A. M., and Arakaki, A. K. (1994). The chaperone connection to the origins of the eukaryotic organelles. *FEBS Lett* **341**: 146-51.
- Vicente, M., Chater, K. F., and de Lorenzo, V. (1999). Bacterial transcription factors involved in global regulation. *Mol Microbiol* **33**: 8-17.

- Vieira, J., and Messing, J. (1982). The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* **19**: 259-68.
- Viscogliosi, E., and Müller, M. (1998). Phylogenetic relationships of the glycolytic enzyme, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from parabasalid flagellates. *J Mol Evol* **47**: 190-9.
- Voskuil, M. I., and Chambliss, G. H. (1998). The -16 region of *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacterial promoters. *Nucleic Acids Res* **26**: 3584-90.
- Voskuil, M. I., Voepel, K., and Chambliss, G. H. (1995). The -16 region, a vital sequence for the utilization of a promoter in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **17**: 271-9.
- Walker, E. M., Howell, J. K., You, Y., Hoffmaster, A. R., Heath, J. D., Weinstock, G. M., and Norris, S. J. (1995). Physical map of the genome of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* (Nichols). *J Bacteriol* **177**: 1797-804.
- Wiemer, E. A., Hannaert, V., van den, I. P. R., Van Roy, J., Opperdoes, F. R., and Michels, P. A. (1995). Molecular analysis of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in *Trypanoplasma borelli*: an evolutionary scenario of subcellular compartmentation in kinetoplastida. *J Mol Evol* **40**: 443-54.
- Wilmotte, A. (1994). Molecular Evolution and Taxonomy of the Cyanobacteria. In: The Molecular Biology of Cyanobacteria, D. A. Bryant (ed), Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp. 1-25.
- Woese, C. R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiol Rev* **51**: 221-71.
- Woese, C. R., and Fox, G. E. (1977). The concept of cellular evolution. *J. Mol. Evol.* **10**: 1-6.
- Woese, C. R., and Fox, G. E. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 5088-90.

Yang, D., Oyaizu, Y., Oyaizu, H., Olsen, G. J., and Woese, C. R. (1985). Mitochondrial origins. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 4443-7.

Yeh, K. C., Wu, S. H., Murphy, J. T., and Lagarias, J. C. (1997). A cyanobacterial phytochrome two-component light sensory system. *Science* **277**: 1505-8.

Zhao, G., Pease, A. J., Bharani, N., and Winkler, M. E. (1995). Biochemical characterization of *gapB*-encoded erythrose 4-phosphate dehydrogenase of *Escherichia coli* K-12 and its possible role in pyridoxal 5'-phosphate biosynthesis. *J Bacteriol* **177**: 2804-12.

Zillig, W., Klenk, H.-P., Palm, P., Leffers, H., Pühler, G., Gropp, F., and Garrett, R. A. (1989). Did eukaryotes originate by a fusion event? *Endocytobiosis Cell Res.* **6**: 1-25.

Zuckerkindl, E., and Pauling, L. (1965). Evolutionary divergence and convergence in proteins. In: *Evolving genes and proteins*, V. Bryson and H. J. Vogel (eds), Academic Press, New York, pp. 97-166.

Zuerner, R. L. (1991). Physical map of chromosomal and plasmid DNA comprising the genome of *Leptospira interrogans*. *Nucleic Acids Res* **19**: 4857-60.

Zuerner, R. L., Herrmann, J. L., and Saint Girons, I. (1993). Comparison of genetic maps for two *Leptospira interrogans* serovars provides evidence for two chromosomes and intraspecies heterogeneity. *J Bacteriol* **175**: 5445-51.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Rüdiger Cerff für die Bereitstellung des interessanten Themas, für seine stete Diskussionsbereitschaft und für die vielen wichtigen Anregungen, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Insbesondere möchte ich auch für die Möglichkeit danken einen Teil dieser Arbeit in einem Labor in Frankreich durchführen zu dürfen.

Herrn Prof. Dr. Ralf-Rainer Mendel danke ich für das Interesse an dieser Arbeit und die Bereitschaft, das Zweitgutachten dieser Arbeit zu verfassen.

Herrn Dr. Franck Chauvat und Frau Dr. Corinne Cassier-Chauvat danke ich für ihre Bereitschaft mich in das Arbeiten mit *Synechocystis* einzuweisen und ihre stete Diskussionsbereitschaft insbesondere auch nach meinem Aufenthalt in ihrem Labor.

Herrn Dr. Henner Brinkmann und Herrn Prof. Dr. William Martin möchte ich für ihre Bemühungen danken, mir die Welt der Phylogenie verständlich zu machen. Ihre vielen Ideen und ihr offenes Ohr waren mir eine große Hilfe.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft sei für ein Promotionsstipendium gedankt.

Den Mitarbeitern am Institut für Genetik danke ich für die angenehme Zusammenarbeit. Insbesondere Herrn „Petersen-Uchte“ bin ich für seine stete Hilfsbereitschaft und kritischen Anregungen dankbar. Carmen Rotte schulde ich Dank für ihre Hilfe bei der Korrektur dieser Arbeit.

Frau Ute Nieländer am Institut für Botanik danke ich insbesondere für ihre Hilfe bei der Anzucht der Cyanobakterien.

Frau Maren Scharfe (GBF) danke ich für ihre Hilfe bei Sequenzierarbeiten.

Für DNA Proben möchte ich Herrn Prof. Dr. Roger Hiller und Dr. Pamela Wrench (Univ. of New South Wales, Sydney), Herrn Dr. Wolfgang Hess (Humboldt Universität, Berlin), Frau Dr. Isabelle St. Girons (Pasteur Institut, Paris) und Herrn Dr. Heuner (Klinikum Charité, Berlin) danken.

Nicht zuletzt gilt mein besonderer Dank meinen Eltern, die mir diese Ausbildung ermöglichten, und meiner Freundin Adrian Amsberry, die mich in jeder Situation stets liebevoll unterstützt hat.